

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1935-1936

N° 8

LA CULTURE DES LEISHMANIES

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(Pharmacie)

présentée et soutenue le 193

PAR

Monsieur JACQUES BERREBBI

Pharmacien de la Faculté de Pharmacie de Paris

JURY { MM. H. COUTIÈRE, *Président*.
L. LUTZ, *Professeur*.
D. BACH, *Agrégé*.

TUNIS

IMPRIMERIE J. ALOCCIO, 6, RUE D'ITALIE

1935

UNIVERSITE DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1935-1936

N° 8

LA CULTURE DES LEISHMANIES

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

(Pharmacie)

présentée et soutenue le 193

PAR

Monsieur JACQUES BERREBBI

Pharmacien de la Faculté de Pharmacie de Paris

JURY { MM. H. COUTIÈRE, *Président*.
L. LUTZ, *Professeur*.
D. BACH, *Agrégé*.

TUNIS

IMPRIMERIE J. ALOCCIO, 6, RUE D'ITALIE

1935



PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE

Administration

MM. GUÉRIN, *Doyen*, O. *, 1.
 P. LEBEAU, *Assesseur*, O. *, 1.
 P. DESPORT, *Secrétaire*, *, 1.

Professeurs

MM.

GUÉRIN, O. *, 1.	<i>Botanique générale.</i>
PERROT, C. *, 1.	<i>Histoire naturelle des médicaments</i>
COUTIÈRE, O. *, 1.	<i>Zoologie.</i>
LEBEAU, O. *, 1.	<i>Pharmacie chimique.</i>
BOUGAULT, O. *, 1.	<i>Chimie analytique.</i>
GORIS, O. *, 1.	<i>Pharmacie galénique.</i>
TASSILLY, O. *, 1.	<i>Physique.</i>
DAMIENS, *, 1.	<i>Chimie minérale.</i>
HÉRISSEY, O. *, 1.	<i>Chimie biologique.</i>
SOMMELET, *, 1.	<i>Chimie organique.</i>
LUTZ, *, 1.	<i>Cryptogamie et Microbiologie.</i>
FABRE, *, 1.	<i>Toxicologie.</i>
LAUNOY, O. *, 1.	<i>Professeur sans chaire.</i>

Doyen honoraire : M. RADAIS, O. *, 1.

Professeurs honoraires : MM. BÉHAL, G. O. *, 1., DELÉPINE, O. *, 1.

Membre de l'Institut : M. GUERBET, *, 1.

Chargés de cours

MM.

Marc HONNORAT, *, 1.	<i>Législation et Déontologie pharmaceutiques.</i>
LAUNOY, O. *, 1.	<i>Pharmacodynamie.</i>
DELABY, *, A.	<i>Hydrologie et Hygiène.</i>
PICON, 1.	<i>Chimie minérale et Minéralogie.</i>
BACH, 1.	<i>Microbiologie.</i>

Agrégés en exercice

MM. DELABY, *, A.
 PICON, 1.
 MASCRÉ, 1.
 FLEURY, 1.

MM. BACH, 1.
 BEDEL, 1.
 RÉGNIER, 1.

Chefs des travaux pratiques

MM.

BEDEL, 1., <i>agrégé</i> , chargé des T.P. de 1 ^{re} année.	<i>Chimie générale.</i>
FLEURY, 1., et RÉGNIER, 1., <i>agrégés</i> , chargé des travaux de.....	<i>Chimie analytique</i>
SOUÈGES, 1.	<i>Micrographie.</i>
LEROUX, 1.	<i>Physique.</i>
DEVAL, *, 1.	<i>Microbiologie.</i>
DELABY, *, A., PICON, 1., et MASCRÉ, 1., <i>agrégés</i> , chargés des travaux généraux de 4 ^e année.	

Bibliothécaire en chef : M. BERNARD, 1.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A LA MÉMOIRE DE MA MÈRE

A MON PÈRE

Très affectueusement.

A MON PARRAIN

MONSIEUR ARTHUR TMIM

*En témoignage de ma vive gratitude
et de ma sincère affection.*

A MES AMIS

A MON MAITRE

MONSIEUR LE PROFESSEUR CHARLES NICOLLE

MEMBRE DE L'INSTITUT

PROFESSEUR AU COLLÈGE DE FRANCE

PRIX NOBEL DE MÉDECINE 1928

DIRECTEUR DE L'INSTITUT PASTEUR DE TUNIS

*Qui m'a si aimablement accueilli dans
ses laboratoires et m'a inspiré le sujet de
cette thèse.*

*Qu'il veuille bien accepter ici, l'expres-
sion de ma profonde reconnaissance et
l'assurance de ma respectueuse affection.*

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE
MONSIEUR LE PROFESSEUR H. COUTIÈRE
MEMBRE DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR
PROFESSEUR DE ZOOLOGIE
A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

*Pour l'honneur qu'il a bien voulu me
faire en acceptant la présidence de cette
thèse.*

A MES JUGES

MONSIEUR LE PROFESSEUR L. LUTZ

CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR
PROFESSEUR DE CRYPTOLOGIE ET DE MICROBIOLOGIE
A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

Très respectueusement.

MONSIEUR LE PROFESSEUR D. BACH

PROFESSEUR AGRÉGÉ
A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

Hommage reconnaissant pour les encouragements qu'il m'a prodigués au cours de ce travail.

A MES MAITRES
DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

Hommage respectueux

A MONSIEUR JULES BOUQUET

DOCTEUR EN PHARMACIE

PHARMACIEN DES HOPITAUX DE TUNIS

*Qui m'a initié dans ma profession et
auquel je suis heureux d'exprimer ma
très respectueuse et très sincère affec-
tion.*

A MONSIEUR LE DOCTEUR CHARLES ANDERSON

SOUS-DIRECTEUR DE L'INSTITUT PASTEUR DE TUNIS

*En remerciement pour les conseils
éclairés qu'il m'a prodigués dans l'éla-
boration de cette thèse.*

A MONSIEUR LE DOCTEUR JEAN LAIGRET

CHEF DE LABORATOIRE A L'INSTITUT PASTEUR DE TUNIS

*En témoignage de ma vive gratitude et
de ma profonde admiration.*

A MONSIEUR ROGER DURAND

DOCTEUR EN PHARMACIE

CHEF DE LABORATOIRE A L'INSTITUT PASTEUR DE TUNIS

Qui m'a constamment dirigé durant ce travail.

Qu'il trouve ici, l'expression de ma grande amitié et de ma vive reconnaissance

A MONSIEUR HECTOR DIACONO

PHARMACIEN SUPÉRIEUR

DOCTEUR EN PHARMACIE

INSPECTEUR DES LABORATOIRES D'ANALYSES MÉDICALES
DE LA TUNISIE

MEMBRE ASSOCIÉ DE L'INSTITUT PASTEUR DE TUNIS

Hommage dévoué.

A MES MAITRES ET A MES AMIS
DE L'INSTITUT PASTEUR DE TUNIS

SOMMAIRE

GÉNÉRALITÉS.....	1
------------------	---

CHAPITRE PREMIER

LE MILIEU NNN

	Pages
Historique.....	17
Préparation classique du milieu.....	18
Technique de l'ensemencement.....	21
Examen des cultures.....	21
Morphologie des leishmanies en culture.....	22
Caractères de culture en milieu NNN.....	23

CHAPITRE II

CULTURE DES LEISHMANIES EN MILIEU NNN MODIFIÉ

A. Modifications de la pression osmotique.....	28
I. Milieu hypotonique.....	28
II. Milieu hypertonique.....	30
B. Modifications de la concentration en ions hydrogène (pH).....	31
C. Modifications des conditions de la culture.....	36
I. Action de la lumière.....	36
II. Action de la température.....	37
III. Chauffage du milieu.....	38
IV. Vieillessement du milieu.....	40
V. Suppression du support solide.....	41
D. Dissociation des divers éléments du sang de lapin entrant dans la composition du milieu NNN.....	41
I. Hémoglobine.....	42
II. Globules rouges.....	43
III. Globules blancs.....	44
IV. Éléments figurés totaux.....	45

	Pages
V. <i>Culture des leishmanies en sérum pur</i>	45
ESSAIS DE REPIQUAGE EN SÉRUM.....	46
Sérum inactivé.....	46
Addition de fibrine.....	46
Addition de leucocytes.....	47
Addition d'hémoglobine.....	48
Addition d'extrait globulaire.....	48
Addition d'une trace d'eau de condensation d'un milieu NNN.....	49
ISOLEMENT D'UNE SOUCHE DE <i>leishmanie</i> SUR MILIEU AU SÉRUM.....	49
E. Remplacement du sang de lapin par le sang de diverses espèces animales.....	51
F. Remplacement du sérum de lapin par le sérum de diverses espèces animales.....	53
G. Modifications apportées à la culture par l'addition, au milieu NNN, d'éléments divers.....	54
I. <i>Addition de glucides</i>	54
II. <i>Addition de sels métalliques</i>	57
III. <i>Addition de glycérol</i>	58
IV. <i>Addition de corps inertes</i>	60

CHAPITRE III

ESSAIS DE CULTURE DES LEISHMANIES DANS DES MILIEUX DIVERS

I. Milieu au petit lait.....	61
II. Milieu au lagmi.....	62
III. Milieux synthétiques, chimiquement définis.....	62
CONCLUSIONS.....	65
Bibliographie.....	67

LA CULTURE DES LEISHMANIES

Généralités

On groupe sous le nom de leishmanioses un certain nombre d'affections dont les agents pathogènes appartiennent à un même genre de protozoaires, les leishmanies. Suivant la localisation de ces parasites dans l'organisme, on distingue les leishmanioses externes ou cutanées, et les leishmanioses internes ou viscérales.

Ces affections, très répandues à la surface du globe, se rencontrent surtout, à l'état endémique, dans l'Inde, dans tout le bassin méditerranéen, en Perse, en Syrie et dans quelques régions de l'Amérique du Sud. Dans l'Inde, la leishmaniose viscérale ou *kala azar* a ses principaux foyers à l'Est, dans les régions basses et humides qui avoisinent les deltas du Gange et du Brahmapoutre et dans la Présidence de Madras, tandis que la leishmaniose cutanée ou Bouton d'Orient, se rencontre à l'Ouest : vallée de l'Indus, Bombay, Delhy, Lahore, etc. Le kala azar sévit aussi sur les côtes méditerranéennes. En Tunisie, où le premier cas de leishmaniose infantile fut observé (35), l'endémie est limitée à la région septentrionale, alors que le Bouton d'Orient se trouve beaucoup plus au sud : Gafsa, Metlaoui, Tozeur. L'Algérie, le Maroc, la Tripolitaine, l'Espagne, la France de Marseille à Nice, le sud de l'Italie, la Sicile, l'île de Malte et la Grèce montrent des foyers endémiques. En Amérique, c'est surtout une leishmaniose cutanéomuqueuse que l'on observe; on la rencontre dans différentes régions du Sud, notamment au Paraguay. Le Bouton d'Orient existe aussi, et il est assez fréquent, en Perse, dans le Caucase, à Bagdad, au Turkestan, en Syrie, en Mésopotamie et en Ethiopie. Quant au kala azar, en dehors des foyers importants cités, il n'est pas rare dans le sud de la Chine, le Turkestan Russe, en Arabie et en Egypte.

Quoique la découverte des leishmanies ne remonte qu'à une date relativement récente, les maladies qu'elles occasionnent étaient connues depuis longtemps. On n'ignorait pas le Bouton d'Alep au milieu du XVIII^e siècle: le clou de Biskra fut observé et décrit en 1844. Le kala azar existait en Grèce sous le nom de *ponos*, ainsi que l'a montré F. Mesnil, depuis un temps immémorial. Il existait, depuis le même temps au moins sans doute dans l'Inde, lorsqu'il fut décrit en 1882 par Mac Naught, médecin de Tura. Mais les auteurs n'étaient pas d'accord sur la nature de l'agent infectieux. Certains admettaient que la maladie était provoquée par l'ankylostome; d'autres, la considéraient comme une forme du paludisme (70-74); d'autres enfin comme une maladie infectieuse différente du paludisme et de l'ankylostomiase. Ce n'est qu'en 1903 que l'on connut la nature exacte de cette affection, dans les circonstances suivantes: un soldat de l'hôpital de Netley (Angleterre) était atteint d'une fièvre irrégulière compliquée de splénomégalie et de dysentérie, connue sous le nom de fièvre dum-dum; il mourait peu de temps après. Dans les frottis de la rate, W. B. Leishman observait un grand nombre d'éléments qui ne correspondaient en rien à ce qui avait été décrit jusque là; comme il étudiait à cette époque le *nagana* et qu'il trouvait, dans les viscères des rats morts de cette trypanosomiase, des éléments semblables à ceux qu'il avait rencontrés chez le soldat, il conclut que l'agent de cette fièvre était un trypanosome (37). C. Donovan, à Madras, faisait connaître à peu d'intervalle, qu'à trois reprises, il avait observé également, dans des frottis de rates post-mortem, les corps décrits par Leishman (22). Il les retrouva encore dans le produit retiré par ponction de la rate chez un enfant atteint d'une fièvre irrégulière: mais n'ayant pas rencontré de trypanosomes dans le sang de ce malade, il émit l'opinion que les corps de Leishman ne pouvaient pas appartenir à ce genre de protozoaires.

A. Laveran et F. Mesnil (33-34), étudiant des frottis de rates qui leur avaient été envoyés par Donovan, font remarquer la grande analogie du parasite avec les piroplasmes et proposent de lui donner le nom de *Piroplasma donovani*. R. Ross (75) le décrit comme un sporozoaire d'un genre nouveau; il crée pour lui le genre *leishmania* et propose le nom de *Leishmania donovani*. Aujourd'hui, la nomenclature s'éta-

blit ainsi : *Leishmania donovani*, Laveran et Mesnil, 1903 (*Piroplasma donovani*, Laveran et Mesnil, 1903; *Leishmania donovani*, R. Ross, 1903; *Leishmania donovani*, var. *Archibaldi*, Castellani et Chalmers, 1919).

Un peu plus tard, le kala azar était identifié avec la maladie de Leishman-Donovan; le problème du kala azar indien était ainsi résolu. Peu après L. Rogers, confirmait ce résultat par la culture (71).

En 1904, E. Cathoire, médecin-major à la Goulette, en Tunisie, examinant les frottis de rate recueillis à l'autopsie d'un enfant de 7 mois mort d'une affection mal définie, y trouva des éléments dont la structure lui sembla particulière. Il adressa ses préparations à A. Laveran qui reconnut, dans ces corps, les parasites que Leishman et Donovan venaient de découvrir (35). Le premier cas de kala azar était ainsi décelé en Tunisie.

En 1907, Ch. Nicolle et E. Cassuto (56) observaient le deuxième cas tunisien chez un enfant de 2 ans à Tunis. Puis Ch. Nicolle et ses collaborateurs publiaient une série d'observations de leishmanioses frappant uniquement les enfants, en Tunisie. Pour tous les cas décrits, les corps de Leishman avaient été rencontrés dans les frottis de rates. Etant donnée la prédilection de la maladie pour les jeunes enfants, Ch. Nicolle proposa de lui donner le nom de *kala azar infantile* et celui de *Leishmania infantum* au parasite. Ch. Nicolle, C. Comte et L. Manceaux inoculent le virus avec succès au chien et au singe (*Macacus sinicus*) (61).

D'autre part, Ch. Nicolle découvre le parasite de la leishmaniose canine à l'état d'infection naturelle chez le chien (60) qu'il dénonce comme le réservoir naturel probable du virus du kala azar infantile en Tunisie. A. Laveran et A. Pettit (1909), puis A. Laveran seul (1912) reproduisent la maladie chez le cobaye, le rat et la souris avec le virus indien, mais n'arrivent pas à infecter le chien et le macaque.

Cette différence expérimentale et celle de l'âge des sujets formaient les deux arguments en faveur de la dualité du kala azar. En 1912, C. Donovan réussit l'inoculation du chien (21) et R. Row (78) celle du singe. A. Laveran, par l'épreuve des immunités croisées, apporte de fortes présomptions en faveur de l'identité des deux virus. D'autre part, des statistiques montraient que l'enfant était assez sou-

vent touché aux Indes, et que l'adulte n'était pas épargné dans les pays qui semblaient être le domaine du kala azar infantile. Dès lors, la théorie uniciste ne connaissait plus d'adversaires et les noms de *kala azar infantile* et de *Leishmania infantum* n'avaient plus de raison d'être; néanmoins on emploie encore, dans le langage courant, indifféremment, les noms de *kala azar infantile* ou *méditerranéen* ou simplement *kala azar*, pour désigner cette affection des enfants du bassin méditerranéen, et on donne aussi bien le nom de *Leishmania infantum* que celui de *Leishmania donovani* à son agent pathogène, quoique les règles de la nomenclature donnent la priorité à ce dernier.

Pendant que se poursuivaient les travaux sur la leishmaniose viscérale, J. H. Wright (83) décrivait le parasite du Bouton d'Orient et le rapprochait des microsporidies. Pour E. J. Marzinowsky et S. L. Bogroff (46) il s'agissait d'un protozoaire voisin des trypanosomes.

C'est en 1908 que Ch. Nicolle (56), réussissant la culture pure du parasite à partir d'un bouton existant chez un chamelier nègre de Tébessa, montrait l'identité morphologique de ce protozoaire avec celui du kala azar; la dénomination de *Leishmania tropica* fut alors adoptée. La nomenclature actuelle s'établit ainsi : *Leishmania tropica*, Wright, 1903; (*Sporozoa furunculosa*, Firth, 1891; *Helcosoma tropica*, Wright, 1903; *Ovoplasma orientale*, Marzinowsky et Bogroff, 1904).

En 1908, Ch. Nicolle et ses collaborateurs montrèrent que le Bouton d'Orient est inoculable au singe (59) et au chien (60). D'autres auteurs l'inoculent avec succès à la souris et au rat. Dès lors, l'étude expérimentale de la maladie devenait possible.

*
* *

Unies par le protozoaire causal, les leishmanioses restent cependant très différentes au point de vue clinique, suivant que le parasite frappe les viscères ou la peau.

Nous avons vu que les kala azar (indien et infantile) constituaient la même maladie du fait de l'identité de leurs agents pathogènes; ils ont même symptomatologie générale, même évolution. Si l'on constate quelques légères différences dans certaines manifestations cliniques,

on peut les mettre sur le compte de l'âge du malade. Nous nous rallions donc à la conception de notre maître Charles Nicolle, selon laquelle, « *Leishmania donovani* et *Leishmania infantum* constituent une seule et même espèce, le kala azar de l'homme est « un », quel que soit le pays où on l'observe et l'âge des malades (55) ».

L'incubation, silencieuse, passe toujours inaperçue; le début est insidieux, les premiers symptômes sont des troubles gastro-intestinaux, plus marqués chez l'enfant, et une fièvre, qui, évoluant pendant des semaines, apportent une modification importante à l'état général. Le malade présente alors une anémie et une asthénie très marquées; la rate commence à devenir perceptible. La *fièvre*, différente de la fièvre palustre par l'absence de clochers thermiques aussi élevés, se produit par poussées irrégulières; *elle ne cède pas à la quinine*.

La période d'état est marquée par l'accentuation des signes observés au début; la rate s'hypertrophie démesurément, pouvant descendre jusqu'au pubis; le foie augmente aussi de volume, mais plus tardivement et à un degré moindre. Chez l'enfant, on observe souvent de l'œdème des extrémités et de la face et une micropolyadénopathie marquée.

L'examen du sang révèle, en plus de la diminution considérable du nombre des globules rouges qui peut descendre à 1.000.000 au millimètre cube, une formule leucocytaire renversée: mononucléaires 60 %, polynucléaires 40 %. La leucopénie est intense: le nombre des globules blancs peut tomber à 1.000 au millimètre cube. Dans quelques cas, on rencontre, dans la formule hématologique, une plaquettopénie, apanage fréquent des formes graves, en particulier des formes hémorragiques. Il est des symptômes accessoires que l'on ne rencontre que dans le kala azar des adultes et dans 5 % des cas seulement: l'apparition de « leishmanides », tâches de pigmentation, érythèmes circonscrits et nodules cutanés spécifiques. Chez l'enfant, la peau est quelquefois le siège d'éruptions de forme vésiculeuse ou bulbeuse, simulant, les premières, la variole, les secondes le pemphigus.

À la période terminale, l'émaciation et la faiblesse générale sont au maximum: le malade prend un aspect squelettique et la mort sur-

vient dans la cachexie la plus complète, dans le marasme, ou bien elle est la conséquence de complications gastro-intestinales, pulmonaires, et, le plus souvent, de phénomènes hémorragiques.

La durée de la maladie est très variable; elle peut aller de deux mois, forme aigüe, à trois ans, forme chronique; les plus fréquentes sont les formes subaigües qui durent huit à douze mois. La guérison spontanée est un fait rare. Aujourd'hui, l'évolution et le pronostic sont favorablement modifiés depuis que l'on sait poser le diagnostic précoce des leishmanioses et depuis que l'on en connaît le traitement spécifique, la médication antimoniale.

La leishmaniose cutanée est une dermatose bénigne, localisée uniquement dans les téguments externes. En Amérique du Sud, il existe une leishmaniose externe ayant tendance à se localiser sur les muqueuses, différente du Bouton d'Orient, au point de vue clinique, mais due probablement à *Leishmania tropica* ou à une espèce très voisine que les auteurs désignent sous le nom de *Leishmania brasiliensis*, Vianna, 1911, (*Leishmania tropica*, pro parte; *Leishmania tropica*, var. *americana*, Laveran et Nattan-Larrier, 1912; *Leishmania americana*, var. *flagellata*; *Leishmania péruriana*, Velez-Lopez, 1913).

La leishmaniose cutanée a reçu plusieurs dénominations suivant les régions: les plus connues sont : Bouton ou Clou de Gafsa, de Biskra, d'Alep, du Nil, du Caire, de Bagdad, du Liban; Bouton d'Orient, de Delhi, de Bombay, de Pendeh, de Bahia; leishmaniose forestière américaine; espundia.

La symptomatologie de cette dermatose est typique. Après une incubation de durée variable et souvent même indéterminée (15 jours à 7 mois), il apparaît, généralement sur les parties découvertes du corps, une nodosité très peu douloureuse qui grossit très lentement; puis la peau s'enflamme et s'ulcère. L'ulcération peut atteindre 10 centimètres de diamètre et se recouvrir de croûtes de coloration brun-foncée.

Cette période ne s'accompagne que très rarement de phénomènes généraux : fièvre et troubles digestifs; elle dure en moyenne de trois à cinq mois. Il n'est pas rare de voir plusieurs boutons se développer dans la même région: l'ulcération est alors plus large,

La période de guérison est caractérisée par une cicatrisation lente et indélébile. La durée moyenne du Clou de Biskra, depuis l'apparition de la nodosité, est en général d'un an. Les complications les plus fréquentes, peu graves d'ailleurs, sont la lymphangite, l'érésypèle et la phlébite suppurée. La guérison est la terminaison normale de la maladie. Malgré quelques rares cas de récidives observés, il est admis que l'immunité est conférée par une première atteinte. Le fait, rapporté par certains observateurs, que les Juifs de Bagdad inoculent le Bouton d'Orient aux jambes des jeunes enfants, afin d'éviter la production naturelle de lésions au visage et les cicatrices disgracieuses qui en résultent, vient à l'appui de cette opinion. On raconte aussi, qu'en Perse, où le Bouton d'Orient est très fréquent, le jeune homme, avant son mariage, exige de sa future épouse la preuve d'une première atteinte de cette dermatose. Chez les animaux d'expérience, il est aujourd'hui démontré qu'il existe une immunité réelle, bien que peu solide, parfois.

Le Bouton d'Orient est inoculable au chien (60), au singe (59), à la souris, au rat, au mérion (*Mériones shawi*). Les chiens paraissent être les seuls animaux chez lesquels on observe la leishmaniose cutanée à l'état d'infection naturelle.

La localisation des leishmanies dans l'organisme est très particulière. Le tissu réticulo-endothélial en est le siège de prédilection. C'est dans les viscères riches en ce tissu, (rate, foie, moelle osseuse et ganglions) qu'elles sont les plus nombreuses. On peut en trouver dans les autres viscères et dans le sang, mais elles y sont beaucoup moins fréquentes.

Elles sont toujours *incluses dans de grandes cellules mononucléaires*. Cette localisation n'est pas la cause, ainsi qu'il arrive pour les hématozoaires du paludisme, d'une pénétration active, c'est uniquement un phénomène banal de phagocytose. Ici, le parasite ne meurt pas; bien au contraire, il s'accommode à sa nouvelle vie, tant et si bien qu'il se multiplie abondamment, aux dépens de la cellule hôte, au point de la faire éclater. Cet accident explique la présence de leishmanies, à l'état libre, dans les frottis.

La présence des parasites dans les tissus permet de poser un diagnostic certain des leishmanioses. C'est dans le sang et dans les vis-

cères, plus particulièrement la rate, le foie et la moëlle osseuse qu'il faut les rechercher.

On trouve rarement les corps de Leishman dans les examens directs d'étalements de sang. Ch. Nicolle et C. Comte (62) effectuent un enrichissement en centrifugeant un mélange de 2 c.c. de sang et de 1 c.c. d'eau physiologique citratée; les parasites sont recherchés dans la couche leucocytaire qui surnage le culot d'hématies; néanmoins, les résultats restent peu probants.

La ponction de la rate fournit un élément de diagnostic très précieux; c'est à ce viscère qu'on doit avoir recours lorsque les autres examens ont été négatifs. Voici comment doit être pratiquée cette ponction pour éviter tout accident (54) : l'essentiel est de bien choisir l'aiguille; contrairement à ce que l'on pourrait croire, l'emploi des grosses aiguilles est à proscrire, elles ramènent beaucoup de sang, peu de matière splénique et peuvent occasionner des accidents. Une aiguille fine, au contraire, se bouche dès qu'elle est introduite dans l'organe par suite de la pénétration, dans la cavité, d'un petit cylindre de tissu: de douces aspirations répétées ramènent assez de matière pour effectuer trois ou quatre frottis et ensemercer quelques tubes. Pour éviter les hémorragies, on doit proscrire, en plus des grosses aiguilles, les aiguilles en platine irridié, qui déchirent les tissus, et les aiguilles usagées et rouillées, qui piquent mal. Donc : emploi exclusif *d'aiguilles en acier, fines et neuves*. La seringue doit être desséchée complètement, l'eau altérant les tissus et donnant ainsi de mauvaises préparations.

On immobilise le malade et on ponctionne immédiatement au-dessous du rebord costal; après la ponction, le patient doit rester couché et immobile, trente minutes environ. Pratiquée avec règle et en suivant toutes les indications ci-dessus, elle est sans danger.

La ponction du foie demande moins de précautions, mais les parasites sont moins nombreux.

Pour rechercher les leishmanies dans la moëlle osseuse, la trépanation du tibia est le plus souvent pratiquée: elle donne aussi de bons résultats, mais elle est plus délicate, douloureuse et parfois dangereuse.

Le diagnostic du Bouton d'Orient se pose exclusivement par la recherche du parasite dans les lésions. Lorsque le bouton n'est pas ulcéré, il suffit de le ponctionner avec une petite seringue munie d'une grosse aiguille, après aseptie rigoureuse de la région. On peut inciser le sommet du bouton avec un vaccino-style et râcler les bords de la section (50). Pour les clous ulcérés, il est souvent bon, après avoir détaché la croûte adhérente, de ne pas se contenter de recueillir le liquide qui suinte à la surface de l'ulcération, mais de prélever un peu de tissu sous-jacent.

Quel que soit le produit prélevé, il sera étalé sur lames; on fixe et colore par un procédé approprié. Les cultures ne peuvent être obtenues que par ponction dans la région profonde, après désinfection sévère de la peau. En milieu contaminé par les bactéries de la peau, les leishmanies ne poussent pas.

Au point de vue morphologique, il n'existe pas de caractères permettant de différencier *Leishmania donovani* et *Leishmania tropica*.

Dans les tissus, les leishmanies se présentent sous leur forme non flagellée. A l'état frais, les parasites libres y sont ovalaires, réfringents, immobiles, mesurant 1,5 à 5 μ de long sur 1 à 3 μ de large. Après fixation et coloration, ils offrent l'aspect de corpuscules ronds, ovalaires ou fusiformes: le *cytoplasme* est finement alvéolaire et renferme une grande *vacuole*, un *noyau* et un *blépharoplaste*. Le noyau est arrondi. Le blépharoplaste, ou *kinétoplaste*, a la forme d'un bâtonnet ou d'un point suivant la face par laquelle il se présente: il comprend deux éléments, le *corps parabasal* et le *blépharoplaste* proprement dit: de ce dernier part un cordon, le *rhizoplaste*, ou *axonème*, qui se termine à l'un des pôles du corpuscule. Le tout est enveloppé dans une coque élastique et résistante, le *périplaste*.

La multiplication s'opère par scissiparité. C'est le noyau qui subit le premier, la bipartition pendant que le rhizoplaste s'élargit puis se divise. Le blépharoplaste subit les mêmes transformations: une cloison médiane y apparaît et les deux leishmanies-filles, ainsi formées, se séparent. Nous verrons la morphologie de la forme flagellée lorsque nous parlerons des cultures.

On peut encore établir le diagnostic des leishmanioses par l'inoculation aux animaux. De tous les animaux d'expérience, le chien et le

singe sont ceux qui se prêtent le mieux au diagnostic du kala azar et du Bouton d'Orient.

Pour le Clou de Biskra, A Laveran (36) préconise de raser la peau, de la face externe des cuisses de l'animal, et, à l'aide d'un vaccinos-tyle, de pratiquer, à un centimètre de distance, trois piqûres obliques à travers l'épaisseur de la peau; on attend que le sang ne coule plus; puis, avec une pince à mors très fins, on introduit une parcelle de matériel virulent, au fond de chaque plaie. On recherche alors les parasites dans l'ulcération qui se produit après une incubation assez courte (4 jours environ).

Pour le kala azar, il suffit de pratiquer une inoculation intraveineuse, intrapéritonéale, ou mieux, intrahépatique, d'une suspension de virus en eau physiologique. Après un temps d'incubation variable, on recherche les parasites par ponction du foie, de la rate (6), ou mieux par trépanation du tibia.

Tout dernièrement (juin 1935) (20), A. Donatien et F. Lestoquard ont insisté sur la constance de l'infection parasitaire de la peau saine dans la leishmaniose viscérale du chien, fait constaté par N. I. Chodukin et F. I. Schewtschenko (15), A. Donatien, F. Lestoquard et L. Parrot (19), et S. Adler et O. Theodor (1). Cette constatation permet à ces auteurs de préconiser la recherche du parasite sur un frot-tis de peau, en vue du diagnostic. La recherche est peut être un peu longue; mais elle est toujours positive. Elle peut être effectuée en n'importe quel point du corps : oreille, peau du ventre, etc...

Il n'est pas toujours aisé d'obtenir, du malade ou de son entourage, l'autorisation de pratiquer la ponction de la rate. Quant à la recherche des leishmanies dans le sang, nous avons vu qu'elle était rarement couronnée de succès. Il est alors nécessaire de rechercher la preuve biologique de la maladie et, pour cela, d'avoir recours à des examens sérologiques qui, sans apporter des éléments de certitude, permettent d'orienter le diagnostic vers le kala azar avec une grande probabilité. L'agglutination, la fixation de l'alexine et les réactions de précipitation ont été les méthodes principales utilisées dans ce but.

Les recherches basées sur la présence d'agglutinines dans le sérum, n'ont donné que des résultats inconstants dus à la tendance des émulsions de leishmanies à l'agglutination spontanée,

La réaction de fixation de l'alexine a été appliquée aux leishmanioses par P. Zdrodowsky et B. Woskressenski (85), puis par L. Nattan-Larrier et L. Grimard-Richard (52). Ces auteurs ont obtenu des résultats assez satisfaisants. Mais la présence des anticorps spécifiques dans les sérums est douteuse, ou, du moins, inconstante. Il faut plutôt accorder une valeur réelle aux tests biologiques suivants, qui traduisent vraisemblablement les modifications des protides sanguins :

L'épreuve de la formol-leucogélification, qui consiste à verser II gouttes de formol du commerce à 40 % dans XX gouttes de sérum du malade; en quelques secondes ou, au plus, en quelques minutes, un double phénomène se produit : gélification puis opacification typiques;

Le test à l'eau distillée ou « globulin-test » qui consiste à verser sur le sérum du malade, quelques gouttes d'eau distillée; il se produit, à la surface de séparation des deux liquides, un anneau opaque net qui persiste lorsque l'eau y est ajoutée en plus grande quantité:

Les tests à l'antimoine, qui consistent à verser, au fond d'un tube contenant le sérum à éprouver, quelques gouttes d'une solution d'un sel organique d'antimoine et notamment d'une solution d'urée-stibamine à 4 %. Il se produit un anneau blanc à la surface de séparation des deux liquides.

L. Nattan-Larrier et L. Grimard-Richard (51) préconisent *la formol-stibosane-réaction* : dans 0 c.c. 5 de sérum suspect, on laisse tomber IV gouttes d'une solution à 10 % de néo-stibosane et 0 c.c. 5 de formol à 40 %. Il se forme de gros flocons d'un blanc grisâtre qui se rassemblent pour constituer un volumineux précipité cailleboté, occupant toute la hauteur du liquide.

Tout récemment, J. Caminopetros (11) a décrit une réaction qu'il considère comme spécifique de la leishmaniose interne :

A 2 c.c. de solution de sulfarsenol à 2 % dans de l'eau distillée, on ajoute goutte à goutte le sérum à éprouver; il se produit, dès l'addition de la première goutte, un trouble qui va en augmentant jusqu'à la septième goutte, pour s'éclaircir, ensuite, pour des doses supérieures de sérum. Les sérums de sujets sains ou atteints d'autres affections ne donnent aucun trouble ou une légère opalescence disparaissant à la troisième, quatrième ou cinquième goutte,

Ces réactions ne doivent pas diminuer d'intensité sous l'influence du traitement quimique.

La réaction de la formol-leucogélification est celle qui donne les résultats les plus constants et celle qui a rallié le plus de suffrages; néanmoins, elle n'a pas de valeur diagnostique absolue. Ces épreuves restent donc des tests de probabilité et seule la recherche des parasites dans les tissus par l'examen direct et la culture apporte la confirmation du diagnostic.

*
* *

Malgré le grand pas fait dans l'étude des leishmanioses, le problème de la transmission des virus reste encore entier.

Depuis de longues années, les expérimentateurs cherchent à expliquer la genèse et la propagation de ces redoutables affections. Le fait qu'il existe deux stades dans l'évolution des leishmanies, flagellé et aflagellé, permet de penser qu'il y a un ou des réservoirs de virus et, partant, un ou des agents transmetteurs. La découverte de ce vecteur certain permettrait de pousser plus avant l'étude expérimentale des leishmanioses et surtout d'enrayer leur extension par des moyens prophylactiques modernes et efficaces.

L'hypothèse de la transmission directe a peu d'adeptes. Pour le Bouton d'Orient, elle a contre elle plusieurs arguments qui la rendent peu vraisemblable : immobilité du parasite dans les lésions, développement des boutons sur des parties du corps où les solutions de continuité sont très rarement provoquées, apparition des épidémies *saisonnnières*. Pour le kala azar, elle serait difficilement compréhensible. Les infections expérimentales directes ont d'ailleurs toujours échoué. Cependant, R. G. Archibald (5) réussit l'infection par voie digestive chez le singe, et Ch. Anderson (2) par la même voie chez le mériion. L'opinion la plus admise est celle de la transmission par un vecteur hématophage.

On admet aujourd'hui que le phlébotome, et notamment *Phlébotomu papatasi*, joue un rôle important dans la propagation du Bouton d'Orient. Cependant, jusqu'à ce jour, la transmission expérimentale

par piqûre de l'insecte a échoué. Seule l'inoculation, sur la peau scarifiée, du produit de broyage de phlébotomes infectés, a été suivie d'une ulcération typique dans laquelle l'examen direct et la culture ont permis de déceler la présence de *Leishmania tropica*. La contamination se ferait donc mécaniquement, par écrasement du phlébotome sur la peau, suivi de grattage.

Les divergences de vue sont fort nombreuses quant à l'agent transmetteur de la leishmaniose viscérale. Tour à tour, les punaises, les puces, les moustiques, les phlébotomes et les tiques ont été incriminés, et les résultats sont fort contradictoires selon les auteurs : les mêmes tentatives, poursuivies avec succès par certains expérimentateurs ont échoué avec les autres.

« Cette conclusion paraît s'imposer, écrit Ch. Anderson (2) : si la lumière qui éclaire le problème s'est faite plus vive celui-ci n'est pas encore résolu. Les travaux que nous venons de passer en revue n'ont que la valeur de travaux d'approche et n'autorisent, tout au plus, que des conclusions provisoires. Scientifiquement parlant, en effet, tout ce que nous pouvons dire se ramène à ceci : l'eau physiologique, le milieu intérieur de la tique, du phlébotome, ne détruisent pas le virus et permettent pendant un temps plus ou moins long de le véhiculer jusqu'à l'animal réactif. C'est tout. Certes, la question est débrouillée. On tient quelques fils et, en reprenant en détail, d'ici, de là, quelques points particuliers, en raisonnant par analogie avec ce que nous ont appris certains problèmes voisins (maladie de Chagas, trypanosomiase des petits mammifères), par exemple, on finira par triompher. A cet égard, l'étude du « sort » du virus chez les différents vecteurs reconnus sera le meilleur critérium comme le veut une loi de biologie générale. Donc, nous sommes encore loin du but. Qui sait si, lorsque nous y toucherons, le chien comme l'homme, n'apparaîtra pas alors comme un cul de sac et s'il ne faudra pas chercher ailleurs le réservoir de virus ? Il est beaucoup d'exemples de voies larges et magnifiques qui n'aboutissent qu'à des impasses et, dût notre orgueil en souffrir, ce que nous individualisons sous le nom de kala azar n'est peut être, sans préjuger de l'avenir et des surprises toujours possibles de l'évolution, que l'aspect anthropocentrique d'un raté actuel de la nature ».

*
**

C'est à L. Rogers (71) que revient le mérite d'avoir, le premier, obtenu la culture des corps de Leishman. Il les prit tout d'abord pour des trypanosomes, puis pour des *herpetomonas*. Le 29 juin 1904, il télégraphiait en effet : « Trypanosomes développés dans les cultures de corps de Leishman ».

Son milieu était simplement constitué par le sang du malade recueilli par ponction splénique et additionné d'une petite quantité de solution stérile de citrate de sodium à 10 % pour empêcher la coagulation. A 22°, la multiplication est rapide. En moins de deux jours, il vit apparaître des formes flagellées. Dans des communications ultérieures (72-73), il préconisait l'addition, au sang, d'une quantité d'acide citrique suffisante pour acidifier légèrement son milieu.

S. R. Christophers (16) confirme les faits découverts par Rogers ; mais il déclare n'avoir jamais vu de trypanosomes. Les mêmes résultats sont obtenus par G. C. Chatterjee (13-14), W. B. Leishman et J. C. B. Statham (38) et J. Mac Kensie (45).

L'existence d'un stade flagellé dans l'évolution des corps de Leishman montrait qu'il ne s'agissait pas, comme le pensaient A. Laveran et F. Mesnil (33-34), de piroplasma. La dénomination de *Leishmania donovani*, proposée par R. Ross était alors universellement adoptée.

Avec le milieu de Rogers, les résultats sont très inconstants. Comme l'indiquent plusieurs observateurs et Rogers lui-même, plusieurs tentatives de cultures échouèrent et en tout cas, lorsqu'ils obtenaient une culture, le repiquage en série n'était pas possible. Seuls, W. B. Leishman et J. C. B. Statham (38) prétendaient avoir obtenu un repiquage positif. Ce milieu ne permettait donc pas l'étude des leishmanies. Plusieurs expérimentateurs essayèrent en vain de préparer un milieu plus favorable.

En 1908, Charles Nicolle, au cours de l'étude célèbre des premiers cas de kala azar observés en Tunisie (56), réussit la culture en série des leishmanies. Il employa le milieu qui avait servi à F. G. Novy et W. J. Mac Neal (53-63-64) pour cultiver quelques trypanosomes. Ce milieu est constitué par de la gélose nutritive, additionnée du tiers de son volume de sang de lapin. C'est ce même milieu que F. Benzan-

gon et Griffon employaient pour la culture de certains microbes qui ne se développaient pas sur les milieux usuels (8). L'ensemencement était fait dans l'eau de condensation: les tubes, placés à la température de 22°, donnaient une culture lente, mais viable et assez riche. Les repiquages en série étaient aisés. Les résultats étaient donc nettement supérieurs à ceux de Rogers tant au point de vue du diagnostic des leishmanioses que de l'entretien des souches.

Quelques mois plus tard, Ch. Nicolle (61) mettait au point un milieu de Noxy-Neal modifié et simplifié, couramment appelé *Milieu NNX* Noxy-Neal-Nicolle.

C'est l'étude méthodique de ce milieu, conçu empiriquement, que nous avons entreprise dans ce travail, sur les conseils de notre maître, Charles Nicolle.

Nous avons voulu rechercher les conditions les plus favorables au développement des leishmanies dans ce milieu, en modifiant sa formule, soit par la variation de l'un de ses constituants, soit par l'addition de produits divers. Nous avons aussi essayé de déterminer le rôle de chacun des éléments qui entrent dans sa composition.

Notre travail commencera par l'étude du « milieu NNX », son historique, sa préparation, les caractères de culture des leishmanies dans ce milieu. Nous examinerons ensuite le comportement de la culture de ces parasites vis-à-vis du milieu NNX *modifié*. Dans un dernier chapitre, nous donnerons un exposé des milieux nouveaux que nous avons étudiés.

CHAPITRE PREMIER

Le milieu NNN

HISTORIQUE

Le 11 février 1908, Ch. Nicolle, étudiant un cas de kala azar infantile tunisien, ensemençait, à partir du produit retiré par ponction splénique, des tubes de gélose nutritive au sang de Novy-Neal en même temps que des tubes de ce même milieu, modifié et simplifié par lui. Il obtenait, dans ces derniers tubes, une culture très abondante, plus riche que dans les premiers; les repiquages en série étaient aussi aisés. Ces résultats étaient confirmés dans tous les cas de kala azar étudiés ultérieurement. C'est sur ce même milieu, qu'un mois plus tard, il réussissait l'isolement du parasite du Bouton d'Orient.

La modification consistait dans la suppression de la viande et de la peptone. La formule originale était la suivante :

Gélose.....	14 grammes
Sel marin.....	6
Eau.....	900 c.c.

Ce mélange était liquéfié à l'autoclave, réparti dans des tubes à essais sans neutralisation ni alcalinisation préalables. On stérilisait et on conservait les tubes de gélose salée. Pour l'emploi, on les liquéfiait à 43°-50° et les additionnait du tiers de leur volume de sang de lapin. Ils étaient ensuite inclinés pendant 12 heures, conservés 3 jours à l'étuve à 37° avant d'être ensemençés, dans le but d'éprouver leur stérilité (durée de temps fâcheuse qui, concentrant l'eau de condensation, la rendait souvent inapte à la culture. Ce temps fut ensuite réduit à 24 heures). Cette formule a subi, depuis, quelques modifica-

lions; nous donnerons plus loin la technique de sa préparation, telle qu'elle est suivie actuellement à l'Institut Pasteur de Tunis.

L'avantage de ce milieu sur celui de Novy-Neal est d'être plus simple et plus constant. Il n'y a pas, en effet, à tenir compte des différences de composition dues à l'emploi de divers échantillons de viande et de peptone et à la réaction du milieu; les substances qui entrent dans sa préparation sont toujours identiques à elles-mêmes : gélose, eau, chlorure de sodium et sang de lapin.

C'est ce milieu, couramment appelé *milieu NNX*, qui est aujourd'hui utilisé dans *tous les laboratoires de recherches pour le diagnostic* des infections à leishmanies et *l'entretien* des souches de ces flagellés. Beaucoup d'autres milieux de culture ont été préconisés pour des besoins particuliers ou simplement pour améliorer le rendement de la culture. Certains auteurs se sont uniquement tenus à apporter quelques modifications au milieu NNX, d'autres ont combiné des milieux nouveaux. Nous n'avons pas jugé utile de donner un historique détaillé de ces innombrables travaux; les principaux seront analysés au fur et à mesure de nos recherches; nous nous contenterons d'indiquer que les résultats ont été toujours peu satisfaisants. Un point sur lequel tous les expérimentateurs paraissent être d'accord, c'est l'inconstance de la culture des leishmanies sur d'autres milieux que le NNX.

PRÉPARATION CLASSIQUE DU MILIEU

Dans un ballon taré, on fait tremper pendant huit heures, 10 grammes de gélose coupée en menus morceaux, dans 1.000 c.c. d'eau salée à 7 gr. 5 ‰; on filtre ensuite sur gaze et on remplace le liquide rejeté par une même quantité d'eau salée à la même concentration; on laisse macérer une deuxième fois pendant 12 heures au moins; on filtre sur gaze; la gélose est essorée puis additionnée d'une quantité d'eau salée à 7 gr. 5 ‰ suffisante pour obtenir 1.100 gr. de milieu. On liquéfie à l'autoclave, 10 minutes à 120°; on laisse refroidir et on rétablit le poids à 1.100 gr. avec de l'eau physiologique; on filtre sur papier Chardin mouillé et on répartit dans des tubes de 18 × 180 à raison de 8 à 9 c.c. de milieu par tube qu'on laisse refroidir verticalement et que l'on conserve ainsi jusqu'au moment de l'emploi.

Dans la pratique courante, lorsque l'on n'a pour but que l'entretien des souches, il est préférable de ne préparer que le nombre de tubes strictement nécessaire à chaque passage.

Pour éviter la dessiccation de la gélose, l'eau de condensation étant ici indispensable, il est prudent de capuchonner les tubes. Pour ce faire, les capuchons de caoutchouc sont bouillis pendant 15 minutes dans une solution antiseptique de fluorure de sodium à 15 gr. ‰. On tire le coton hors du tube sur une longueur de 1 cm. avec une pince dont les mors sont flambés; on le passe sur la flamme d'un bec Bunsen jusqu'à ce qu'il noircisse puis on l'enfonce dans le tube à 1 cm. de l'orifice; on saisit le capuchon par son fond avec une pince, on l'égoutte et on le passe rapidement sur la flamme; on en pose un bord sur l'orifice du tube et on le maintient avec le pouce gauche; on saisit, avec la pince, le bord opposé du capuchon dont on coiffe le tube, en évitant de le toucher avec les doigts.

Il arrive, quelquefois, que l'on emprisonne un excès d'air entre le coton et le capuchon, ce dont on s'en rend compte par la convexité de ce dernier. Il est alors nécessaire de s'en débarrasser en faisant passer un mors flambé de la pince entre le capuchon et le tube jusqu'à l'orifice de ce dernier. Cette manipulation permet une conservation de très longue durée. Dans les pays chauds, il est préférable néanmoins de les mettre à l'abri des grosses chaleurs.

Pour rendre ce milieu propre à la culture des leishmanies, il suffit de lui ajouter l'élément qui contient les substances nécessaires à leur nutrition, le sang de lapin. Ce sang est recueilli par ponction aseptique du cœur de cet animal. Au préalable, les tubes de gélose salée sont décapuchonnés et les cotons retirés à 1 cm. de l'orifice; on liquéfie la gélose au bain-marie à 100° et on la maintient à une température variant entre 48° et 52°, que l'on aura bien soin de surveiller au thermomètre. Pendant ce temps on ponctionne le lapin.

Pour ce faire, l'animal est immobilisé sur le dos, dans un appareil à contention, ou simplement maintenu par un aide. On arrache ou bien on rase les poils de la région précordiale que l'on badigeonne de teinture d'iode. Avec une seringue de 20 c.c. munie d'une aiguille de 30-9/10 à biseau court, le tout stérilisé au four, on pique au point où les battements de cœur sont les plus sensibles, ce qui correspond le

plus souvent au troisième espace intercostal, à 3 $\frac{m}{m}$ environ du bord sternal gauche. Avec la pointe de l'aiguille on palpe le cœur et, lorsque l'on sent les battements dans la seringue on pénètre brusquement. Le sang refoule le piston; on aspire alors lentement et quand la seringue est pleine, on la retire d'un coup sec, on enlève l'aiguille pour éviter toute contamination possible par la peau, on passe rapidement l'embout sur la flamme et on répartit le sang dans les tubes de gélose liquéfiée de la façon suivante. Le tube est pris de la main gauche; la main droite tient la seringue entre le pouce et le majeur; avec l'index, on pousse le piston; les deux derniers doigts libres permettront de déboucher les tubes; on flambe l'orifice, on verse environ 0 c.c. 8 de sang, on refflambe l'orifice, on rebouche et on fend le tube à un aide qui le roule, avec précaution pour ne pas produire de mousse, et l'incline.

Si on ne dispose pas d'aide, on replace les tubes au fur et à mesure dans le bain-marie où on les a pris et, lorsque tous les tubes ont reçu le sang, on les roule et on les incline.

Cette opération doit être pratiquée le plus rapidement possible pour éviter la coagulation du sang dans la seringue et diminuer les risques de contamination.

Les tubes sont inclinés pendant 12 heures à la température du laboratoire de manière à assurer la solidification de la gélose et son adhérence aux parois du tube. On les porte ensuite à l'étuve à 37° dans la position verticale pendant 24 à 48 heures pour provoquer le dépôt de l'eau de condensation et éprouver la stérilité du milieu.

On élimine les tubes qui présentent un développement microbien; cet accident est très rare lorsqu'on opère avec soin. On les met ensuite 24 à 48 heures à la glacière, précaution qui a l'avantage de faire exsuder le plus de liquide possible et permet aux substances nutritives de passer dans l'eau de condensation. Quelquefois la gélose se casse, ce qui comprime le culot et augmente la quantité du liquide; on peut d'ailleurs provoquer cette cassure, ou tout au moins le décollement de la gélose, en faisant tomber le tube verticalement à plusieurs reprises sur une surface dure. Au sortir de la glacière les tubes sont prêts à être ensemencés.

TECHNIQUE DE L'ENSEMENCEMENT

Les leishmanies poussent surtout dans l'eau de condensation des tubes de milieu NNN; l'ensemencement doit donc être effectué dans cette partie du tube. On ensemence avec une ou deux gouttes d'une culture antérieure âgée de 7 à 30 jours, à l'aide d'une pipette ou simplement avec le contenu d'une ôse de platine.

On peut obtenir des cultures positives tant qu'il reste des leishmanies vivantes dans le milieu, c'est-à-dire entre 55 et 65 jours, mais il vaut mieux, pour éviter un insuccès, partir d'une culture âgée de 15 à 20 jours. Pour les primocultures, l'ensemencement est effectué à partir d'une goutte de sang du malade ou d'une suspension de l'organe infecté dans de l'eau physiologique, ou mieux dans de l'eau de condensation d'un milieu NNN stérile. On aura bien soin de vérifier l'absence de toute souillure de bactéries ou de champignons, en ensemençant deux tubes de chacun des milieux suivants :

bouillon

gélose nutritive

gélose au sang

qui seront placés à l'étuve à 37° pendant 48 heures, et

gélose glucosée de Sabouraud

à l'étuve à 25° pendant le même temps.

Nous ne jugeons pas utile d'insister sur les précautions de technique élémentaire qu'il est indispensable de respecter étroitement, lors des passages, afin d'éviter les contaminations, toujours possibles, des cultures.

Après l'ensemencement, les tubes sont capuchonnés stérilement et maintenus constamment à la température de 22 degrés.

EXAMEN DES CULTURES

L'examen à l'état frais est pratiqué entre lame et lamelle, à l'ultramicroscope. Pour prélever une parcelle de la culture, il suffit de toucher l'eau de condensation avec l'extrémité très effilée d'une pipette Pasteur stérile : la petite quantité de liquide qui monte par capillarité est largement suffisante pour un examen,

Pour avoir de bonnes préparations colorées, A. Laveran (31), d'après Ch. Nicolle, recommande de prendre certaines précautions : lorsqu'on effectue des frottis avec le liquide de condensation du milieu NNN, les préparations sont toujours mauvaises parce que les principes albumineux qui existent dans le liquide forment un précipité très gênant; il est préférable de centrifuger le liquide pendant 15 à 20 minutes et de laver le culot à deux reprises; on peut alors faire des frottis que l'on fixe et colore par le procédé de Romanowsky ou un de ses dérivés.

La coloration par la méthode de Lestouard nous a donné de bons résultats (39) : on fixe pendant 10 minutes avec un mélange de deux parties de teinture d'iode pour 98 parties d'alcool à 95°; on lave à l'alcool ordinaire pour éliminer l'excès d'iode; on sèche et colore pendant une heure avec de l'eau distillée neutre (pH 7) additionnée de 1/15 de sérum de cheval et de trois gouttes de solution de Giemsa par centimètre cube; on lave et on sèche.

MORPHOLOGIE DES LEISHMANIES EN CULTURE

Nous avons vu que, dans les tissus parasités, les corps de Leishman présentaient la forme atlagellée ou *forme leishmania*. C'est dans les cultures qu'ils passent par la seconde phase de leur évolution, le stade flagellé que l'on désigne sous le nom de *leptomonas* par suite de l'analogie qu'ils présentent dans les caractères morphologiques, avec certaines formes d'évolution des trypanosomes et les parasites flagellés, les *leptomonas*, que l'on trouve dans le tube digestif de certains insectes.

Le premier signe de la transformation du stade *leishmania* en *leptomonas* consiste dans l'augmentation sensible du volume du parasite; on reconnaît facilement le *noyau* et le *blépharoplaste*, tous deux de dimensions un peu plus grandes. Le corpuscule s'allonge ensuite et devient piriforme ou nettement ovalaire. Pendant ce temps, le *rhizoplaste* prolifère par une extrémité, sous-périplastique, repousse devant lui le *périplaste*, s'en enveloppe comme d'une gaine, à mesure qu'il croît en longueur, et provoque ainsi la formation d'un filament cylindrique grêle et flexible, dont il constitue l'axe. A ce moment, il

diffère complètement de l'aspect qu'il présente dans l'organisme; c'est un flagellé typique.

Sous cette forme *leptomonas* il est alors constitué par un corps fusiforme dont les dimensions, suivant les individus, peuvent varier de 8 à 24 μ en longueur, sur 4 à 15 μ pour la largeur. Le flagelle offre toujours une longueur égale ou légèrement plus grande que celle du corps; il part de l'extrémité antérieure, toujours plus large que l'extrémité postérieure; il est relié au blépharoplaste par le rhizoplaste. Le noyau, arrondi ou ovalaire, est toujours plus gros que le blépharoplaste, en forme de bâtonnet. Ces deux éléments sont toujours disposés de la même manière, le petit du côté du flagelle, le grand du côté de l'extrémité opposée. La leishmanie avance, flagelle en avant, avec une vitesse comparable à celle des infusoires, grâce aux mouvements ondulatoires et vibratoires de son cil.

A aucun moment, on ne remarque de membrane ondulante.

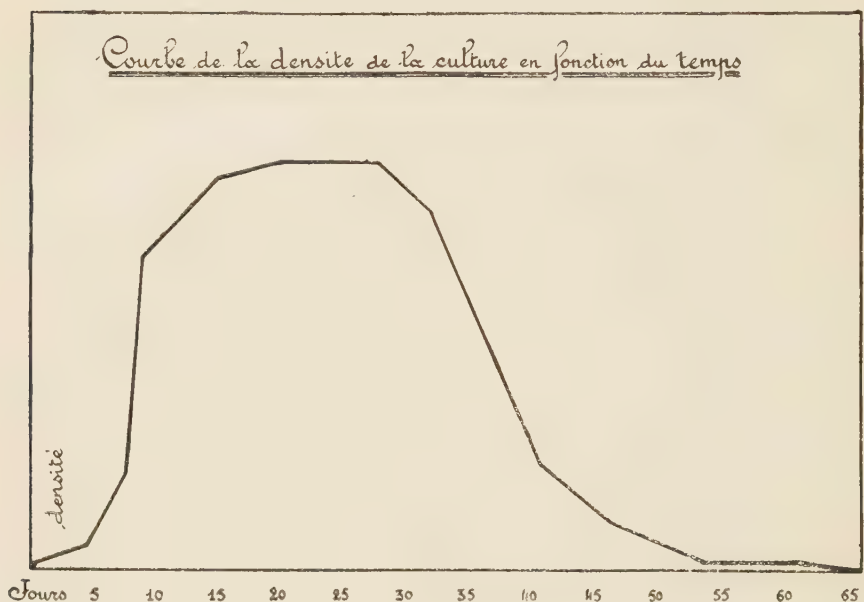
La forme *leptomonas* des corps de Leishman n'a jamais été rencontrée dans l'organisme animal.

CARACTÈRES DE CULTURE EN MILIEU NNN

Les tubes de milieu NNN,ensemencés et placés à une température de 22°, montrent, au début, un développement plutôt lent. Jusqu'au troisième jour, la culture paraît négative; on ne rencontre que quelques flagellés épars, isolés, assez mobiles. A partir du quatrième jour, les formes de multiplication paraissent; la division longitudinale en est le seul mode; elle peut se produire à tous les stades de développement du parasite; elle commence tantôt par le noyau, tantôt par le blépharoplaste, ou les deux à la fois; il ne semble y avoir aucune règle à cet égard. La division du flagelle se fait souvent en premier lieu, surtout pour *Leishmania tropica*. Au dernier stade de la division, les deux leishmanies-filles ne sont plus accolées que par l'élément qui a subi en dernier lieu la bipartition; elles se séparent ensuite en deux éléments identiques, animés d'un mouvement très rapide.

Jusqu'au vingtième jour environ, la multiplication se poursuit, enrichissant la culture en flagellés. A ce moment, la densité diminue

petit à petit et au 40-45^e jour, les leishmanies sont plutôt rares. Entre le 55^e et le 65^e jour, les organismes vivants disparaissent de la culture; le repiquage devient impossible. On peut établir la courbe suivante de la richesse en leishmanies de la culture.



La mobilité suit à peu près la même courbe; en même temps que l'arrêt de la multiplication, on voit apparaître, à côté des formes très mobiles qui constituent la majorité, des éléments minces, peu rapides; souvent le flagelle oscille seulement sur place d'un mouvement très lent; ce stade précède de peu la mort du parasite. En dehors de ces formes de souffrance, on remarque la présence de quelques rosaces où les parasites sont agglomérés, le flagelle dirigé vers le centre.

A mesure que la culture vieillit, les formes peu mobiles ou immobiles augmentent ainsi que le nombre des rosaces.

Au cours de leur développement, on constate quelques modifications dans la forme des leishmanies. Si nous suivons l'évolution d'un parasite sitôt après la bipartition, nous constatons qu'il est d'abord

trapu, de dimensions moyennes, et très mobile. Il s'allonge et s'effile ensuite, sa mobilité diminue. Bientôt le corps n'est plus réduit qu'à un fil et prolonge le flagelle. Tous ces parasites ne suivent pas cette modification; certains se divisent alors qu'ils ont encore leurs dimensions normales; d'autres meurent avant d'arriver à ce stade; d'autres enfin s'agglutinent en rosaces.

CHAPITRE II

Culture des leishmanies en milieu NNN modifié

Dans ce chapitre nous nous proposons d'étudier le comportement des leishmanies dans le milieu NNN, modifié soit par la variation de l'un de ses constituants, soit par la modification des conditions de la culture, soit encore par l'addition d'éléments divers.

Toutes nos expériences ont été effectuées avec trois souches différentes de leishmanies et une souche de *leptomonas*, identiques au point de vue des caractères cultureux et morphologiques. Nous nous sommes toujours placés dans les mêmes conditions en suivant le protocole d'expérience :

- 1° Préparation du milieu;
- 2° Répartition dans des tubes de 18 × 180;
- 3° Pour chaque milieu et par souche, on ensemence deux tubes à l'aide d'une goutte de culture en milieu NNN âgée de 15 jours;
- 4° Ensemencement de deux tubes de milieu NNN classique, comme témoin, pour chaque expérience;
- 5° Examen quotidien des cultures jusqu'au cinquième jour après l'ensemencement, puis tous les cinq jours.

ORIGINE DES SOUCHES

Nous avons employé comparativement trois souches de leishmanies dénommées *K.A.*, *B.O.*, *X.*, et une souche de *leptomonas* dénommée *G.2*, de la collection de l'Institut Pasteur de Tunis, qui nous ont été remises le 25 août 1934.

Souche *K.A.*

Leishmania donovani. — Isolée d'un cas tunisien de kala azar infantile, en septembre 1910. Entretienue par passage sur milieu NNN. Elle nous a été remise à son 603^e passage.

Souche B.O.

Leishmania tropica. — Isolée, en novembre 1909, d'un clou de Gafsa d'origine tunisienne évoluant depuis cinq mois : 594^e passage.

Souche X.

Leishmania canis. — Isolée en décembre 1911, d'un chien de fourrière atteint de leishmaniose canine naturelle : 555^e passage.

Souche G2.

Leptomonas du gecko. — Isolée, en avril 1917, d'un gecko, *Tarentola Mauritanica*, à Dehibat (Sud tunisien), par Ed. Chatton : 408^e passage.

Nous avons entretenu ces souches par passages, sur milieu NNN, tous les 21 jours.

Disons tout de suite que ces espèces se sont montrées presque toujours identiques dans les milieux étudiés. Néanmoins, nous insisterons lorsqu'une souche se sera comportée différemment des autres.

A. MODIFICATIONS DE LA PRESSION OSMOTIQUE

Le milieu NNN est isotonique; la pression osmotique y est établie grâce à l'addition, à la gélose, de 7 gr. 50 de chlorure de sodium par litre. Nous avons étudié le développement des leishmanies dans ce milieu, lorsqu'on faisait varier la pression osmotique; nous avons pu ainsi établir les limites de concentration en Cl Na dans lesquelles la culture était possible.

I. — Milieu hypotonique

Miss Robertson (69) a insisté sur l'influence de la baisse de la pression osmotique comme cause déterminante de la division de certains trypanosomes, en étudiant le trypanosome du cyprin doré. S'appuyant sur ces conclusions, A. Ponselle (66-67) obtient la culture du trypanosome de l'anguille, *Tr. granulosum*, puis d'autres trypanosomes (*Tr. inopinatum*, *Tr. lewisi*, etc.) sur un milieu NNN totalement dépourvu de ClNa; il constate que le milieu devient défavorable lorsque la tonicité est supérieure à 4 ‰ en ClNa. H. Galliard (26) insiste aussi sur le rôle de l'hypotonie, « qui exerce une influence nettement favo-

nable sur la richesse et la durée des cultures de *Tr. cruzi*, évoluant rapidement et permettant d'observer plus facilement, par élimination des formes de vieillissement, les différents stades de l'évolution des trypanosomes métacycliques et les formes de dégénérescence, en particulier des formes de division à la période terminale ».

Nous avons recherché si les leishmanies trouvaient aussi un milieu plus favorable, en abaissant la pression osmotique du milieu.

Dans la technique habituelle de préparation du milieu NNN, nous avons remplacé l'eau à 7 gr. 5 ‰ par de l'eau salée de moindres concentrations. Nous avons préparé un milieu exempt de chlorure de sodium et des milieux contenant des doses croissantes de ce sel, depuis 1 gr. jusqu'à 7 gr. par progression de 1 gr.

Avec une concentration inférieure à 4 gr. de ClNa par litre, nous n'avons jamais pu obtenir de culture des leishmanies. Au 8^e jour, l'examen étant resté négatif, pour les milieux à 0, 1, 2 et 3 ‰, nous avons pratiqué des réensemencements en milieu NNN isotonique dans lequel nous n'avons constaté aucun développement; nous avons conclu que, non seulement les leishmanies ne se multiplient pas dans un milieu où la tonicité est inférieure à 4 ‰ en ClNa, mais qu'elles ne s'y conservent pas. Nous avons pu suivre, dans ces tubes, l'évolution des quelques leishmanies apportées par l'ensemencement : les deux premiers jours, leur morphologie ne présente aucune modification; dès le 3^e ou 4^e jour, leur mobilité diminue, le flagelle oscille avec difficulté; la leishmanie se gonfle, devient large et trapue. Ces caractères s'accroissent de plus en plus; vers le 7^e jour, elle devient énorme, le corps est piriforme et ne peut plus se déplacer, mais le flagelle oscille encore sur place d'un mouvement très lent; la leishmanie ne tardera pas à éclater. A aucun moment on ne voit de formes de division.

Dans le milieu à 4 ‰, la multiplication est possible, mais elle est encore assez lente; elle ne commence pas avant le 5^e jour; la culture reste constamment peu riche; la densité maxima est atteinte vers le 12^e jour; on voit ensuite le nombre des flagellés diminuer rapidement; vers le 18^e jour, les formes énormes et immobiles en constituent la grande majorité. Au 25^e jour il n'y a plus d'organismes vivants dans la culture : le repiquage en milieu NNN isotonique se montre négatif.

Avec 5 ‰ de ClNa, la culture est normale au début; elle n'accuse

pas de différence avec le milieu NNN classique, mais elle n'est pas aussi prospère et sa durée est légèrement diminuée: les formes immobiles, beaucoup moins volumineuses que celles rencontrées dans les milieux précédents, sont déjà fort nombreuses au 32^e-35^e jour; la vitalité ne dépasse pas 50 jours.

Les milieux à 6 et 7 ‰ de sel se comportent comme le milieu à 7,5 ‰, tant au point de vue de la richesse et de la durée de la culture, que de la mobilité et de la morphologie des leishmanies.

Il ressort de ces expériences que *l'hypotonie est nettement défavorable* à la culture des leishmanies, contrairement à ce qui se passe pour les trypanosomes.

II. — Milieu hypertonique

A notre connaissance, personne n'a tenté la culture des leishmanies ou des trypanosomes sur des milieux hypertoniques. L'hypotonie s'étant montrée défavorable pour les leishmanies, il était intéressant de savoir si l'augmentation de la pression osmotique n'avait pas une influence favorable sur la culture de ces parasites.

Nous avons préparé des milieux à 15, 30, 35 et 40 grammes ‰ en ClNa, en suivant la même technique que pour la préparation du milieu NNN hypotonique.

Le milieu à 15 ‰ s'est montré très favorable à la culture des leishmanies. Dès le deuxième jour qui suit l'ensemencement, on voit déjà de nombreuses formes de multiplication; le développement est très rapide et vers le 5^e jour la culture est luxuriante; cette densité se maintient très longtemps; les formes de souffrance paraissent vers le trentième jour, et la culture commence à s'appauvrir. Vers le 60^e jour, il n'y a plus de formes mobiles; on ne voit donc pas d'amélioration quant à la durée de la culture.

Avec 30 ‰ de ClNa, le cycle évolutif est extrêmement rapide; le maximum de la courbe est atteint le douzième jour. Très tôt, les leishmanies prennent la forme effilée et longue que l'on ne rencontre que le 25^e jour dans le milieu classique; la durée de la culture ne dépasse pas 26 à 28 jours.

Dans un milieu contenant 35 ‰ de ClNa, les leishmanies vivent avec difficulté; elles sont peu mobiles; la multiplication ne se produit

que chez quelques individus; le développement est très lent et la culture reste constamment très pauvre; elle ne dure d'ailleurs pas plus de 15 jours.

Avec 40 ‰, les parasites ne se développent point; ils conservent néanmoins leur vitalité pendant quelques jours. Si nous suivons, ici, l'évolution des leishmanies apportées par l'ensemencement, nous constatons que, contrairement à ce qui se passe en milieu hypotonique, le corps s'allonge considérablement, s'étire et finit par devenir fili-forme, prolongeant le flagelle qui perd peu à peu de sa mobilité jusqu'à devenir complètement immobile; c'est la mort du parasite.

En résumé, contrairement à ce qui se passe pour les trypanosomes, l'abaissement de la pression osmotique a une influence néfaste sur la multiplication des leishmanies, tandis que l'élévation de la pression osmotique se montre favorable au développement de ces parasites, en culture.

B. — MODIFICATIONS DE LA CONCENTRATION EN IONS HYDROGÈNE pH.

La notion de pH, concentration en ions Hydrogène, a acquis une importance considérable en biologie depuis les recherches de Sörensen (1909). Son application aux milieux de culture a permis d'ajouter un élément important à l'étude du déterminisme des microbes. Dans la pratique bactériologique, les milieux de culture sont ajustés à un pH donné suivant le microbe à étudier. On sait que les bactéries exigent une réaction plutôt alcaline, tandis que les cryptogames poussent mieux dans un milieu à réaction légèrement acide.

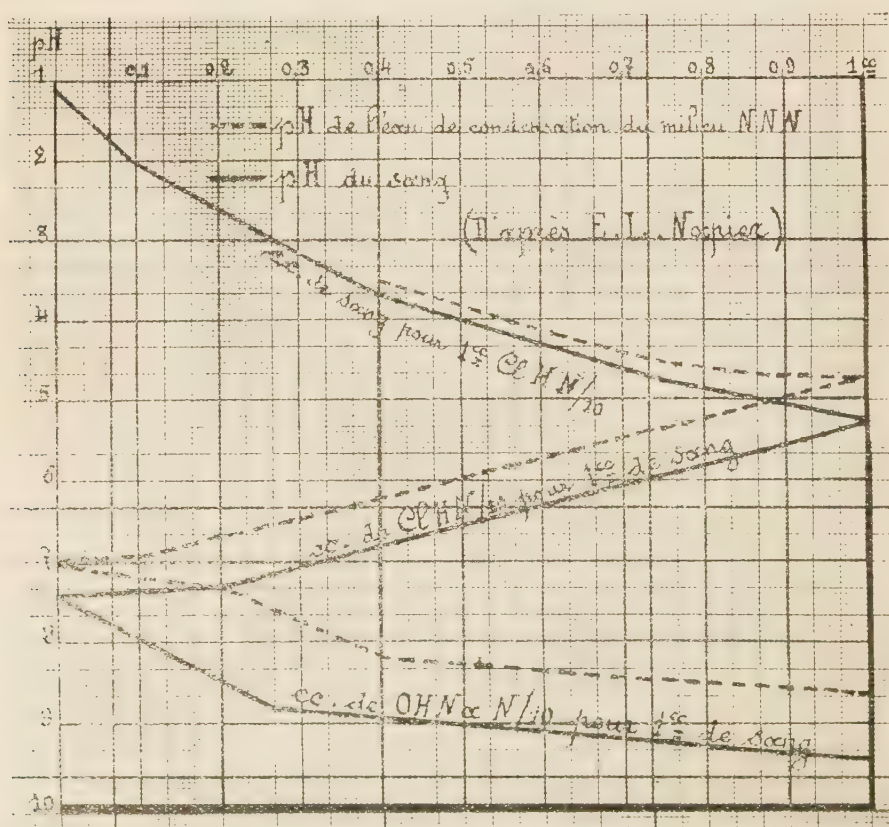
Nous avons voulu déterminer les limites de concentration en ions H dans lesquelles les leishmanies pouvaient se développer, ainsi que le pH optimum des cultures de ces flagellés.

Les leishmanies se multipliant dans l'eau de condensation des tubes de culture, c'est le pH de ce liquide qui devra subir les diverses variations envisagées.

Pour préparer des milieux NNN à pH différents, nous avons suivi la méthode décrite par E. L. Napier (49). Cet auteur a établi des courbes donnant les diverses quantités de ClH N/10 ou de OHNa N/10 qu'il faut ajouter au milieu NNN pour faire varier son pH. Son étude est basée sur la remarque suivante : les constituants du milieu NNN

sont : l'eau, la gélose, le chlorure de sodium et le sang de lapin; les trois premières substances sont neutres; le pH final dépend donc uniquement du sang de lapin. Les proportions d'acide ou d'alcali à ajouter doivent être calculées par rapport au sang versé. Par tâtonnement, Napier arrive à préparer des dilutions sanguines à pH croissants, en additionnant le sang de CHH N/10 et de OHNa N/10 . Pour déterminer le pH de tels mélanges, Napier dialyse sur sac de collodion en eau physiologique neutre; il détermine alors colorimétriquement le pH de cette dernière solution. Il répète la même expérience avec le milieu NNN; il ajoute à la gélose salée liquéfiée, CHH N/10 ou OHNa N/10 et le sang de lapin dans les proportions qu'il avait calculées dans l'expérience précédente. Il détermine le pH de l'eau de condensation en dialysant sur sac de collodion. Il constate alors que la courbe subit une simple translation.

Voici le graphique résumant toutes ces expériences :



Mais la détermination du pH de l'eau de condensation doit être pratiquée huit jours, au moins, après la préparation du milieu. En effet, Napier, étudiant les modifications spontanées du pH du milieu NNN, constate que celui-ci, qui est de 7,7 le jour de sa préparation, augmente au fur et à mesure du vieillissement du milieu pour atteindre une valeur presque fixe, pH 7, le huitième jour, valeur qui n'augmente que très lentement par la suite; elle est à 6,9 au 21^e jour.

D'autre part, l'acide ou l'alcali doivent être additionnés après la stérilisation du milieu et avant l'addition de sang, pour éviter la digestion de la gélose et la transformation des éléments du sang.

La quantité de gélose est la même dans tous les tubes, de manière à avoir un volume du milieu toujours identique; nous avons choisi 9 c.c.

En suivant le graphique, nous avons préparé des milieux de pH croissants, depuis 3,5 à 9,5, par intervalle de 0,5. Pour chaque valeur de pH il a été préparé trois tubes de chaque souche et toutes les expériences ont été répétées trois fois, de façon à diminuer les variations individuelles, variations d'ailleurs exceptionnelles et toujours de peu d'amplitude.

pH 3,5.

La gélose salée est liquéfiée à 100°, puis maintenue à 50-52°. Avec une pipette stérile, on verse 1 c.c. de ClH N/10 stérile, puis 0 c.c. 4 de sang de lapin défibriné. On roule les tubes: on les incline jusqu'à refroidissement; on les place à l'étuve à 37° pendant 24 heures, puis on les laisse 7 jours à la température du laboratoire. On ensemence alors.

L'examen suivi jusqu'au 15^e jour, ne montre *pas de développement des leishmanies*.

pH 4.

En suivant la même technique, on verse 1 c.c. de ClH N/10 pour 0 c.c. 55 de sang.

Pas de développement.

pH 4,5.

La courbe montre qu'il faut ajouter à la gélose salée liquéfiée, 1 c.c. de ClH N/10 et 0 c.c. 75 de sang.

Aucun développement.

pH 5.

Les proportions sont 0 c.c. 9 de ClH N/10 pour 1 c.c. de sang.
Aucun développement.

pH 5,5.

Les tubes de gélose sont additionnés de 0 c.c. 75 de ClH N/10 et de 1 c.c. de sang de lapin. Dès le 3^e jour qui suit l'ensemencement, il apparaît quelques flagellés en division; leur nombre croît jusqu'au 10^e-12^e jour où la richesse atteint son maximum; les leishmanies sont alors très mobiles, mais la densité n'en est pas élevée; la durée de la culture ne dépasse pas 20 à 22 jours. Au cours de leur brève évolution, la morphologie des leishmanies subit quelques modifications; le corps devient plus petit, tandis que la longueur du flagelle reste constante; le corps se rapetisse de plus en plus et finit par devenir complètement rond, ressemblant à un gros *coccus*, mais l'on distingue encore le flagelle et, accolés, le noyau et le blépharoplaste. On penserait à la forme kystique, décrite par certains auteurs, n'étant la persistance du flagelle, immobile d'ailleurs, et l'insuccès du repiquage en milieu NNN classique.

pH 6.

Cette valeur du pH est obtenue par addition, au tube de gélose, de 0 c.c. 5 de ClH N/10 et de 1 c.c. de sang de lapin défibriné. Dans ce milieu, les leishmanies se développent à leur aise; le début de la culture est identique à celui du milieu NNN; la richesse croît rapidement et, au 30^e jour, les cultures sont luxuriantes; les flagellés sont très mobiles. Peu à peu les formes de souffrance paraissent; on commence à rencontrer de nombreuses rosaces, formées par l'agglutination d'un nombre incalculable de leishmanies. Au bout du second mois, *il n'y a plus d'organismes vivants dans la culture.*

pH 6,5.

On emploie 0 c.c. 3 de ClH N/10 et 1 c.c. de sang.

La marche de la culture est identique et la richesse aussi grande que pour pH 6; on voit, de même, des rosaces de dimensions considérables; la durée de la culture reste voisine de 60 jours.

pH 7.

C'est le pH du milieu NNN témoin, huit jours après sa préparation, sans addition aucune.

pH 7,5.

Le même graphique donne les proportions de sang et de OHNa N/10 à employer pour obtenir les pH alcalins; il révèle que, pour avoir le pH 7,5, il faut ajouter, à la gélose, 0 c.c. 25 de OHNa N/10 et 1 c.c. de sang.

La culture suit une marche parallèle à celle du témoin, tant au point de vue de la richesse que de la durée et de la mobilité.

pH 8.

Les proportions sont de 0 c.c. 37 de OHNa N/10 pour 1 c.c. de sang.

La culture est encore identique à celle des milieux à pH 7 et 7,5.

pH 8,5.

La courbe donne les chiffres suivants : 0 c.c. 85 de OHNa N/10 et 1 c.c. de sang. La multiplication ne commence que le 5^e ou 6^e jour. Les leishmanies restent peu nombreuses pendant toute la durée de la culture qui ne dépasse pas une quinzaine de jours.

pH 9.

Cette valeur ne figure pas sur le graphique de Napier, mais en prolongeant la courbe, on voit qu'il est nécessaire d'employer 1 c.c. 4 de OHNa N/10 pour 1 c.c. de sang.

A ce pH, le développement est très lent; on ne voit plus que 2 à 3 leishmanies par champ; les formes de division sont rares, sauf pour la souche *B.O.* où l'on rencontre souvent des individus à deux flagelles, mais nous savons que c'est une forme normale de l'évolution de *Leishmania tropica*. Cette culture ne dépasse pas 10 jours; c'est plutôt une conservation qu'une multiplication.

pH 9,5.

Le graphique ne donne pas non plus cette valeur du pH. Nous avons calculé qu'il fallait 1 c.c. de OHNa N/10 pour 0 c.c. 8 de sang.

A ce pH, les flagellés ne poussent point.

En résumé, une légère acidité favorise nettement le développement des leishmanies et permet d'obtenir des cultures luxuriantes. En milieu alcalin, ces flagellés semblent mieux s'adapter, mais leur multiplication y est ralentie.

Cette expérience nous permet de préciser que *les leishmanies peuvent se développer dans un milieu où le pH est compris entre 5,5 et 8,5, le pH optimum étant de 6 à 6,5.*

L'influence favorable de l'acidité avait été observée déjà par Rogers (72-73) qui avait modifié son premier milieu en ajoutant de l'acide citrique. Ces constatations lui avaient permis d'incriminer comme vecteurs les punaises, dont le contenu stomacal est acide, dans la propagation des leishmanioses.

L'acidité présente un avantage certain, celui d'empêcher les bactéries de se développer, en cas de contamination accidentelle, d'autant plus facilement que la culture se fait à 22°.

C. MODIFICATIONS DES CONDITIONS DE LA CULTURE

I. — Action de la lumière

Deux tubes de cultures de chaque souche, âgées de 15 jours, sont exposés à l'action des rayons solaires et examinés toutes les cinq heures. Après dix heures d'exposition, les leishmanies perdent de leur mobilité, qui, à la 15^e heure, est fort diminuée; à la 20^e heure, la culture ne contient aucun flagellé vivant.

A la lumière diffuse et à l'obscurité, les leishmanies se développent normalement.

L'action inhibitrice du soleil est due probablement à la présence des rayons ultra-violets. Porcelli-Titone (68) a étudié l'action directe des rayons ultra-violets artificiels sur des cultures de *Leishmania donovani* et de *Leishmania canis*; les cultures ont été exposées aux rayons U.V. fournis par une lampe Haeraens aux vapeurs mercurielles. Les résultats, qui ont été à peu près les mêmes pour les deux souches, peuvent se résumer comme il suit : l'exposition aux rayons U.V. pendant dix à vingt minutes empêche la multiplication des parasites et diminue sensiblement leur mobilité; une exposition d'une durée de 20 à 40 minutes diminue fortement leur mobilité; une exposition de plus de 40 minutes la fait disparaître.

Dans les rayons solaires l'action des rayons ultra-violets est très atténuée et retardée par leur moindre intensité et la présence d'autres rayonnements; c'est ce qui explique cette différence de temps.

II. -- Action de la température

L'influence de la température sur la culture des leishmanies a été étudiée par plusieurs expérimentateurs. Déjà, Rogers, en imaginant son milieu au sang citraté qui lui avait permis de découvrir le stade flagellé des corps de Leishman, avait cherché la température optimale pour le développement de ces parasites en culture. « A 37°, écrit-il, les parasites disparaissent en 24 heures. A 27°, ils se multiplient rapidement, mais meurent en peu de jours. A 22°, ils vivent plus longtemps et se multiplient ». Christophers constate aussi que l'optimum de température dans le milieu de Rogers est 22°. G. Di Cristina et Mitra (18) et G. Franchini (24) concluent de la même façon.

Nous avons tenu à répéter ces expériences avec nos 4 souches que nous avons soumises à des températures de 3, 10, 14-15, 20-22, 28-30, 34 et 37 degrés.

Pour chaque température, nous avons placé, d'une part, une série de tubes qui venaient d'être ensemencés, et, d'autre part, une série de tubes de cultures, âgées de 15 jours. Les tubes de la première série sont examinés selon le protocole habituel. Dans la deuxième série, nous prélevions un tube tous les jours: pour chaque tube nous faisons un examen à l'ultra-microscope et un repiquage en milieu NXX, à 22°.

A la glacière (3-4°).

La première série de tubes nous a permis de nous rendre compte qu'il ne se produisait aucune multiplication à la température de la glacière. Dans la seconde série, les tubes, examinés le onzième jour, ne montrent pas de leishmanies mobiles et le repiquage reste sans succès.

Cette expérience nous apprend donc que les *leishmanies* se conservent à la température de la glacière une dizaine de jours environ, mais ne peuvent s'y multiplier.

A 10°.

La même expérience, répétée pour cette température, donne les résultats suivants: pas de multiplication des leishmanies, mais conservation beaucoup plus longue qu'à la glacière, pouvant atteindre 20 à 25 jours

A 14-15°.

C'est à cette température que la multiplication commence à paraître. Les cultures partent au 3^e jour et suivent une marche normale; mais leur richesse en leishmanies est faible et leur durée ne dépasse pas 40 à 45 jours.

A 20-22°.

C'est la température optima, celle à laquelle nous plaçons nos tubes témoins. La marche de la culture, à cette température, a été indiquée au chapitre I (voir p. 24). C'est à 22° que tous les laboratoires pratiquent la culture des leishmanies en milieu NNN.

A 30°.

La première série de tubes montre un développement ralenti; on voit des formes de multiplication, mais elles sont plutôt rares et la culture est pauvre. La conservation des leishmanies y dépasse 20 jours.

A 34°.

A cette température, la culture est très inconstante. Certains tubes ont montré un développement; d'autres, de la même souche, sont restés stériles. Dans les tubes où la multiplication se produit, la densité, la mobilité et la durée sont extrêmement faibles. Il semble qu'on ait atteint, ici, la limite supérieure de la température. La conservation varie entre 5 et 8 jours.

A 37°.

A l'étuve à 37°, la multiplication ne se produit pas et elle s'arrête en 2 ou 3 jours pour les leishmanies en cours d'évolution.

En résumé, les limites de température de culture des leishmanies sont 14° et 34° et la température optima est 22°.

III. — Chauffage du milieu

Les milieux au sang chauffé ont été imaginés par C. Mathis et utilisés, pour la première fois, dans le but de simplifier la préparation des milieux de culture et d'éviter les précautions délicates de la ponc-

tion aseptique du cœur de lapin et de la répartition du sang dans les tubes. « De plus, écrit cet auteur (47-48), ils assurent aux milieux une plus grande fixité, les composés albuminoïdes, chauffés, se modifiant plus lentement que les composés albuminoïdes crus. Enfin, on peut réussir aisément de très bonnes préparations colorées qui, en particulier, n'ont pas ce fond teinté des préparations faites avec les cultures en milieu non chauffé. Cela tient sans doute à ce que le liquide de condensation de notre milieu, toujours limpide, est peu chargé en substances albuminoïdes. La stérilisation du milieu total permet d'obtenir ces avantages ».

Mathis emploie trois procédés de chauffage :

- 1° Chauffage discontinu, 2 ou 3 fois à 75-80°, $\frac{1}{2}$ heures à 1 h. $\frac{1}{2}$.
- 2° Chauffage au B.M. ou à l'autoclave à 100°, $\frac{1}{2}$ heure.
- 3° Chauffage à l'autoclave à 120°, 20 à 30 minutes.

Les essais avaient été pratiqués, avec la gélose Noxy-Neal pour les trypanosomes (47) et la gélose NNN pour les leishmanies (48).

M. Lwoff a employé les milieux au sang chauffé pour certains trypanosomes (42).

Nous avons utilisé, de notre côté, le milieu de Mathis pour les 4 souches de flagellés qui étaient à notre disposition.

Quel que soit le procédé de chauffage employé, le milieu est préparé, sans les précautions d'aseptie habituelles, puis soumis à la stérilisation. Après cette opération, les tubes sont inclinés pendant 12 heures puis placés, 24 à 48 heures, à l'étuve à 37°. Le milieu prend un aspect grumeleux, dû à la coagulation des protides sanguins, et une couleur brune, due à la décomposition de l'hémoglobine, ce qui l'a fait dénommer *Milieu chocolat*. L'eau de condensation est limpide, mais toujours en très faible quantité. On peut l'augmenter par addition d'eau physiologique stérile, comme le conseille Mathis.

Nous avons obtenu des résultats très inconstants. La stérilisation à 120° s'est montrée néfaste au repiquage. Les primocultures sont positives, mais ne durent pas plus d'un mois; la mobilité est atténuée; les subcultures ne sont pas possibles. La tyndallisation, beaucoup moins pratique, donne de meilleurs résultats, quoique très inconstants : les premières cultures sont positives, les formes culturales sont identiques à celles que l'on observe dans le milieu NNN, mais la durée

de la culture est diminuée. Quant aux subcultures, les résultats diffèrent d'un tube à l'autre. Pour la souche *B.O.*, aucun des 4 tubes ensemencés n'a pu être repiqué. Avec la souche *X.*, 1 tube a pu être réensemencé 3 fois et 1 tube une seule fois. Avec la souche *K.A.*, 3 tubes sur 4 nous ont donné une seule subculture. Avec la souche *G. 2*, 2 tubes ont donné 3 subcultures et les 2 autres s'arrêtèrent à la primoculture.

En résumé, malgré les nombreux avantages que présentent les milieux au sang chauffé, ils ne peuvent, par suite de l'insuccès des repiquages, constituer un milieu propre à l'entretien des souches de leishmanies.

IV. — Vieillessement du milieu

La préparation habituelle du milieu NNN se fait, comme nous l'avons vu, en deux temps. Dans le premier temps on prépare la gélose salée qui est conservée en tubes capuchonnés, jusqu'au moment de l'emploi; l'addition du sang de lapin constitue le deuxième temps. La période qui sépare ces deux temps est très variable suivant les besoins. Nous avons réduit à zéro cette période en conservant les tubes capuchonnés après l'addition du sang. Les substances nutritives diffusent ainsi lentement dans l'eau de condensation, qui s'en trouve alors chargée au moment de l'ensemencement. Il était nécessaire de savoir si ce vieillissement du milieu n'était pas néfaste à la culture des leishmanies.

Nous avons ensemencé des tubes âgés de 8 jours, 15 jours, 1 mois et 2 mois. La culture se fait aussi bien dans tous les tubes; le développement est précoce, mais l'amélioration est peu sensible, et la richesse et la durée ne sont pas diminuées.

Cette modification présente pourtant un inconvénient, celui de réduire la quantité d'eau de condensation au fur et à mesure du vieillissement, malgré le capuchonnage. On peut d'ailleurs remplacer le liquide évaporé par de l'eau physiologique stérile sans modifier la marche de la culture.

V. — Suppression du support solide

Certains auteurs attirent l'attention sur la nécessité d'un *substratum* neutre, inerte, pouvant servir de support à la culture des leishmanies. Dans le milieu XNN la gélose remplirait cette fonction.

L'expérience suivante nous permet d'infirmer cette opinion. Des tubes de milieu XNN sont préparés et conservés 15 jours à la température du laboratoire. Cette précaution permet à l'eau de condensation de se charger des substances nutritives. On transvase ce liquide, avec une pipette stérile, dans de petits tubes à hémolyse et on ensemente avec une goutte d'une culture de 15 jours. L'examen régulier des tubes montre que la culture suit exactement la même courbe que si la gélose était présente. Comme pour les milieux vieillies, l'évaporation est rapide. On peut encore en rétablir le niveau par addition d'eau physiologique stérile.

La suppression du support solide, outre qu'elle démontre l'inutilité d'une *assise* pour la culture des leishmanies, présente des avantages :

1° On peut préparer, à l'avance, une grande quantité de liquide et le conserver, en tubes scellés, très longtemps. On répartit en petits tubes à hémolyse au moment de l'emploi.

2° On peut expédier des cultures de leishmanies, ou des milieux de culture, à de longues distances, en petites ampoules scellées.

D. DISSOCIATION DES DIVERS ÉLÉMENTS DU SANG DE LAPIN ENTRANT DANS LA COMPOSITION DU MILIEU NNN

Tous les milieux, liquides ou solides, qui, depuis Rogers, ont été préconisés pour la culture des leishmanies, contiennent du sang. Il est certain que le ou les éléments nécessaires au développement de ces flagellés, se trouvent dans ce liquide biologique, mais il est douteux que le sang total doive être présent dans le milieu. Nous avons dissocié le sang de lapin en ses divers éléments et préparé des milieux avec chacun d'eux.

Le sang est constitué par un liquide, le plasma, tenant en suspension les éléments figurés. Le sérum est du plasma défibriné. Les éléments figurés comprennent les globules rouges, renfermant de l'hémoglobine, les globules blancs et les hémotoblastes

I. — Hémoglobine

La majorité des expérimentateurs s'accordent à donner à l'hémoglobine le rôle principal de la nutrition des trypanosomidés. A. J. Salle et C. L. A. Schmidt (79), les premiers, concluent que *Leishmania tropica* ne pousse pas sur un milieu dépourvu d'hémoglobine. R. Row (78) insiste sur la nécessité de la présence de cet élément dans les cultures de leishmanies; pour cet auteur, il est bon que l'hémoglobine soit dissoute dans un milieu fluide et ne soit pas contenue dans les hématies. Il préconise un milieu obtenu en laquant du sang de lapin soit par addition d'eau distillée, soit par refroidissement; il ajoute une solution de ClNa à 12 ‰ et chauffe à 56° pour détruire l'alexine; plus tard, il prépare le même milieu gélosé (77). Ces milieux ne démontrent nullement la nécessité de l'hémoglobine, tous les éléments du sang y figurant. Ce n'est autre que la formule du milieu NNN dans laquelle le sang est laqué. Certains auteurs prétendent même que le laquage du sang, permettant la diffusion complète de l'hémoglobine, est nocif aux leishmanies. Récemment A. et M. Lwoff (41-43), dans une série d'études sur le métabolisme de plusieurs espèces de trypanosomidés (*Leptomonas cténocéphali*, *Strigomonas fusciculata*, etc.) ont insisté sur la nécessité du sang dans les milieux de culture (41-43-44). Pour ces auteurs, l'hémoglobine agirait surtout par la fonction péroxydasique de l'hématine, c'est-à-dire par son *Fer actif* (facteur X de Thjotta et Avery) (44).

Nous avons préparé des milieux avec de l'hémoglobine pure, obtenue de la façon suivante :

On fait une ponction aseptique du cœur de lapin et on recueille 20 c.c. de sang dans un tube à centrifuger contenant 2 c.c. de solution de citrate de sodium à 5 %. On agite puis on laisse reposer quelques heures pour décanter la plus grande partie du plasma. On remplit le tube avec de l'eau physiologique stérile et on centrifuge; le liquide surnageant est décanté avec précaution par un système simple de siphonnage. On lave le culot d'hématies à trois reprises avec de l'eau physiologique et centrifugation. Après le dernier lavage, les hématies sont additionnées d'eau distillée stérile, en quantité suffisante pour obtenir un volume total double du volume de sang prélevé, c'est-à-dire 40 c.c. L'hémolyse se produit. Il ne reste plus qu'à se débarrasser des stromas globulaires et des globules blancs. Dans ce

but, on centrifuge très fortement et on décante la solution d'hémoglobine limpide.

Toutes ces opérations doivent être pratiquées avec l'aseptie la plus rigoureuse; mais il est néanmoins nécessaire de stériliser la solution par filtration à la bougie Chamberland L3. C'est avec cette solution d'hémoglobine que nous préparons nos milieux. Elle correspond à une solution de sang au demi.

a) MILIEU LIQUIDE.

Dans de petits tubes à hémolyse, nous avons réparti 1 c.c. de la solution d'hémoglobine et 1 c.c. de solution stérile de ClNa à 13 ‰, pour établir l'isotonie.

On ne constate aucun développement de leishmanies.

b) MILIEU SOLIDE.

Dans la préparation habituelle du milieu NNN, nous avons remplacé le sang de lapin par une quantité double de la solution d'hémoglobine. On obtient un milieu transparent de couleur rouge sang. L'eau de condensation est abondante et l'hémoglobine y diffuse dès le deuxième jour, lui communiquant une coloration rosée. Onensemence le lendemain.

A aucun moment on n'aperçoit de multiplication. Les flagellés apportés par l'ensemencement perdent, peu à peu, leur mobilité, puis meurent en moins de 48 heures.

En résumé, l'hémoglobine, si elle est un élément nécessaire, n'est pas seule suffisante au développement des leishmanies, en culture.

II. — Globules rouges

S'il reste douteux que l'hémoglobine soit l'élément du sang indispensable au développement des leishmanies, il est certain que l'excès lui en est toxique. En introduisant, dans le milieu, les hématies non hémolysés, comme on le fait dans le milieu NNN classique, on

obtiendrait peut-être, par diffusion lente et partielle de l'hémoglobine dans l'eau de condensation, un milieu favorable.

Le sang est prélevé dans 2 c.c. de citrate de sodium à 5 % et centrifugé. Le culot est lavé à trois reprises avec de l'eau physiologique stérile. On sépare la couche blanchâtre qui surnage le dépôt d'hématies et qui est constituée par les globules blancs. On ramène au volume de sang initial avec de l'eau physiologique stérile et on répartit dans des tubes de gélose salée liquéfiée à raison de 0 c.c. 8 par tube. On ensemence après apparition de l'eau de condensation.

La multiplication des leishmanies ne se produit pas dans un tel milieu.

III. — Globules blancs

Nous savons que, dans l'organisme, les corps de Leishmán sont toujours inclus dans les leucocytes et que, malgré que cette localisation soit sans doute la conséquence du phénomène banal de la phagocytose, le parasite s'y accommode et même s'y multiplie. Les substances composant les globules blancs, suffiraient donc à son développement. Nous avons essayé de chercher si ces mêmes substances suffisaient au développement de la forme « leptomonas », en préparant un milieu composé de gélose, d'eau physiologique et de leucocytes.

Pour séparer les globules blancs des hématies et du plasma nous avons employé la technique, utilisée par Ch. Nicolle pour la recherche des leishmanies dans le sang périphérique des malades (62). Nous l'avons légèrement modifiée pour notre besoin.

Dans un gros tube à centrifuger contenant 2 c.c. de solution de citrate de sodium à 5 % on recueille 50 c.c. de sang de lapin. On centrifuge, on décante et on lave le culot à trois reprises avec l'eau physiologique stérile. On recueille alors, avec une pipette stérile, la couche leucocytaire blanchâtre qui surnage le dépôt d'hématies. On la transvase dans un petit tube stérile de 5 $\frac{m}{m}$ de diamètre et on centrifuge une dernière fois pour éliminer les quelques globules rouges qui auraient pu être entraînés. Les leucocytes, prélevés, sont mis en suspension dans 10 c.c. d'eau physiologique. Cette suspension servira à faire les milieux suivants :

1° Incorporation à la gélose, salée liquéfiée, à raison de 1 c.c. par tube;

2° La gélose est d'abord inclinée puis mise à l'étuve à 37° pour provoquer l'apparition de l'eau de condensation. On ajoute, à ce liquide, 0 c.c. 5 de la suspension de globules blancs.

Nous n'avons constaté de développement dans aucun tube. De plus, les leishmanies disparaissent rapidement.

IV. — Eléments figurés totaux

Si les hématies, ni les leucocytes ne suffisent au développement des cultures de leishmanies, la présence simultanée des deux sortes de globules apporterait peut-être l'ensemble des éléments nutritifs.

Les éléments figurés sont débarrassés de toute trace de plasma par lavage et centrifugation. La suspension est faite avec le culot, sans séparation de la couche leucocytaire.

La culture n'est pas possible.

V. — Culture des leishmanies en sérum pur

Nous avons essayé de cultiver les leishmanies dans un milieu à base de sérum sanguin pur. Pour obtenir du sérum exempt de toute trace d'hémoglobine, il est nécessaire de prendre certaines précautions. Le sang est recueilli par ponction aseptique du cœur de lapin, dans un tube propre et bien sec. On le place 1 heure à l'étuve à 37°; le caillot se rétracte, emprisonnant les hématies; on le met ensuite 24 heures à la glacière; le sérum est alors bien décanté, il se montre limpide et légèrement jaunâtre. On le prélève avec précaution et on le soumet à une centrifugation prolongée. On le répartit, alors, dans des tubes de gélose salée liquéfiée, à raison de 0 c.c. 5 de sérum par tube.

La technique suivie est semblable à celle que nous employons pour le milieu NNX habituel; seul, le sérum remplace le sang total. On obtient un milieu transparent, incolore ou jaune paille suivant la

pigmentation du sérum. L'eau de condensation est incolore, limpide et en quantité appréciable. On ensemence avec une goutte d'une culture de 15 jours, ou mieux, en râclant avec un fil de platine, la gélose débarrassée de son eau de condensation. Ainsi, on n'introduit aucune trace d'hémoglobine avec les leishmanies ensemencées.

Au 3^e ou 4^e jour, on aperçoit un début de multiplication. Au 5^e jour, les formes de division sont nombreuses. Au 20^e jour, la culture est très riche; cette densité se maintient jusqu'au 30^e jour environ, puis diminue lentement : au 45^e jour, les leishmanies mobiles sont rares, mais ne disparaissent complètement de la culture qu'entre le 55^e et le 60^e jour. La mobilité et la morphologie des flagellés sont normales dans ce milieu.

Nous voyons donc que *l'évolution de la culture est sensiblement identique à celle observée dans le milieu NXX au sang total.*

ESSAIS DE REPIQUAGE EN SÉRUM.

Nous avons essayé en vain d'obtenir des subcultures : *tous les repiquages ont été négatifs.* Nous avons réensemencé à partir de cultures en sérum âgées de 5, 10 et 20 jours sans jamais avoir de résultats positifs. Nous avons aussi pratiqué sans résultat, des ensemencements larges, avec V, X, XV, et XX gouttes d'eau de condensation d'une culture très riche.

Nous avons tenté la culture des leishmanies en sérum inactivé; nous avons cherché, dans les éléments figurés du sang, la substance nécessaire à la subculture. Voici les résultats que nous avons obtenus :

Sérum inactivé.

Le sérum frais est remplacé par du sérum de lapin, chauffé 30 minutes à 56° pour détruire l'alexine. Cette modification n'apporte aucun changement à la culture des leishmanies : la richesse, la mobilité et la durée sont les mêmes que dans le milieu au sérum frais.

Le repiquage est négatif.

Addition de fibrine.

Nous avons remplacé le sérum par du plasma sanguin, obtenu par centrifugation du sang citraté. Les résultats ont été très inconstants :

tantôt nous avions des cultures normales, tantôt des cultures très pauvres; d'autres fois, il n'y avait aucune multiplication. Les réensemencements ne nous donnèrent que des succès. Cependant, en partant d'une culture de 10 jours d'une densité normale, nous avons pu obtenir une subculture dans 1 tube sur 3 qui avaient été ensemencés; mais le développement s'arrêta vite; au bout de 8 jours, il n'y avait que des cadavres de flagellés.

Devant cette inconstance, nous avons incriminé la présence du citrate de sodium. Nous avons alors préparé un *plasma synthétique* en mélangeant du sérum à une solution de fibrine ainsi obtenue :

On ponctionne un lapin; le sang est recueilli dans un pot ban stérile contenant des billes de verre. On agite pendant 5 minutes en imprimant au récipient un mouvement circulaire afin de ne pas dilacérer la masse de fibrine. On prélève cette dernière avec des pinces flambées; on la lave à l'eau distillée jusqu'à ce qu'elle devienne blanche, puis à l'alcool et enfin à l'éther. On décante la plus grande partie de l'éther et on laisse évaporer le reste à l'air libre. On verse alors, sur la fibrine, 10 c.c. d'eau distillée contenant 5 gouttes de lessive de soude. On hâte la dissolution par digestion à l'étuve à 37° pendant 2 heures. On neutralise avec quelques gouttes d'acide acétique dilué et on stérilise par filtration à la bougie Chamberland L3.

On additionne le sérum de lapin de la moitié de son volume de la solution de fibrine ainsi préparée et répartit le mélange dans des tubes de gélose salée liquéfiée à raison de 1 c.c. par tube.

Les cultures sont toujours positives et n'offrent aucune différence avec les cultures obtenues dans le sérum pur.

Les repiquages sont pratiqués sans succès.

Addition de leucocytes.

Nous avons vu que, dans les milieux au sang chauffé, la primoculture était positive et le repiquage presque toujours négatif. L'élément nécessaire au repiquage serait donc thermolabile; il est possible que ce soit un ferment. Nous savons que les leucocytes sont riches en diastases de toutes sortes. Nous avons donc introduit de ces éléments par l'addition, au sérum, d'une suspension de globules blancs.

La préparation de cette suspension a été indiquée plus haut (voir p. 44). On en mélange ensuite une pour deux parties de sérum et on répartit.

Cette addition ne permet pas d'obtenir la culture en série des leishmanies.

Addition d'hémoglobine.

Si l'hémoglobine n'est pas nécessaire au développement des leishmanies, elle peut être indispensable pour obtenir des subcultures.

Nous avons préparé un milieu en ajoutant, à la gélose salée, un mélange de 4 parties de sérum pour 1 partie de la solution d'hémoglobine qui nous avait servi à la préparation du milieu à l'hémoglobine pure (voir p. 42).

Les cultures furent positives; le développement n'était nullement favorisé par la présence de cet élément et le réensemencement ne nous donna que des échecs.

Cette expérience permet d'affirmer que *l'hémoglobine n'est pas l'élément indispensable au développement des leishmanies*, en culture et que le sérum, seul, contient toutes les substances nécessaires à leur nutrition. En effet, on pourrait penser que si les leishmanies poussent dans le milieu au sérum pur, c'est grâce à l'hémoglobine introduite par l'ensemencement, soit à partir d'un milieu NNN, soit à partir d'un organe d'animal infecté; dans ces conditions, l'addition d'hémoglobine pure au sérum, comme nous l'avons fait dans cette expérience, aurait suffi pour obtenir des subcultures, résultat que nous n'avons pu avoir.

Addition d'extrait globulaire.

H. Agulhon et R. Legroux obtiennent une culture abondante de microbes, tel le bacille de Pfeiffer, en incorporant, au milieu, de l'extrait globulaire.

Nous avons étudié l'influence de cet extrait sur la culture des leishmanies en milieu au sérum, en vue d'obtenir des subcultures.

Le sang est citraté, puis centrifugé; le culot d'hématies est lavé à deux reprises avec l'eau physiologique. Après le dernier lavage, on étend le culot de 4 fois son volume d'eau salée à 9 ‰ et on chauffe lentement au

bain-marie à 75°, en agitant régulièrement dès que la température approche de 65°. On maintient 15 minutes à 75°-80°. On filtre chaud sur papier mouillé; on clarifie sur terre d'infusoires. On vérifie l'absence de matières protidiques et on stérilise par filtration à la bougie Chamberland L3.

On mélange ce liquide a du sérum dans la proportion de 1 pour 4. On répartit dans des tubes de gélose salée liquéfiée à raison de 1 c.c. par tube. Après collection de l'eau de condensation, on ensemence.

Cette addition n'apporte aucune modification à la culture des leishmanies en gélose-sérum et la culture en série n'est encore pas possible.

Addition d'une trace d'eau de condensation d'un milieu NNN.

En ajoutant à l'eau de condensation des tubes de milieux au sérum pur, une trace infime d'eau de condensation d'un milieu NNN au sang total, on obtient un repiquage positif. Pour réussir des cultures en série, il est nécessaire de remettre cette trace à chaque passage.

ISOLEMENT D'UNE SOUCHE DE LEISHMANIE SUR MILIEU AU SÉRUM.

Nous savons qu'en partant d'une culture de leishmanies en milieu NNN, on peut obtenir une primoculture sur milieu au sérum.

Il était intéressant de savoir si, sur ce même milieu, en partant du stade *leishmania*, on pouvait obtenir la forme *leptomonas*. D'autre part, la culture, si elle réussissait, pourrait peut-être être repiquable, la leishmanie n'étant pas encore habituée à vivre sur un milieu au sang. On sait, en effet, que l'on peut arriver à cultiver un microbe dans un milieu qui lui est en général défavorable, en modifiant progressivement des constituants du milieu, sur lequel, il peut ensuite bien pousser; après un certain nombre de passages, la bactérie peut même ne plus pousser sur le premier milieu. L'échec de nos repiquages pouvait être dû à ce que les souches utilisées avaient été habituées à vivre dans un milieu au sang.

Le 29 juillet 1935, M. Anderson nous prévient qu'il doit sacrifier un chien, expérimentalement infecté de leishmaniose viscérale; ce chien fait partie d'une série, inoculée d'un virus canin et destinée aux nombreux travaux que ce savant poursuit sur le kala azar.

Nous avons alors préparé 12 tubes de milieu NNN au sang total et 12 tubes de milieu au sérum frais de lapin.

Le 1^{er} août, l'animal est sacrifié. Au préalable, nous avons prélevé, par ponction de la jugulaire, 20 c.c. de sang que l'on a citratés. Ce sang nous a servi à ensemercer 4 tubes de chacun des 2 milieux, à raison de V gouttes par tube; le reste est conservé tel quel (milieu de Rogers). On fait quelques étalements de sang que l'on colore au Giemsa-Lestoquard.

Après autopsie de l'animal, nous avons prélevé la rate et un tibia. Une portion de la rate, grosse comme un pois, est broyée stérilement dans 5 c.c. d'eau physiologique. Cinq gouttes de cette suspension sont ensemençés dans 4 tubes de chaque milieu. On fait quelques frottis que l'on colore.

D'autre part, le tibia est coupé en son milieu; la section est flambée, et la moëlle, prélevée avec une grosse pipette stérile, est mise en suspension dans 1 c.c. d'eau physiologique stérile et ensemençée dans 4 tubes de milieu au sang total et 4 tubes de milieu au sérum, à raison de II gouttes par tube. Des frottis sont colorés et examinés.

Voici les résultats que nous avons obtenus :

Sang.

Frottis : *pas de corps de Leishman.*

Milieu de Rogers : *aucun développement au 20^e jour.*

Milieu NNN : *aucun développement.*

Milieu au sérum : *aucun développement.*

Rate.

Frottis : *présence de parasites peu nombreux.*

Milieu NNN : un tube sur 4 a donné une *culture positive*; le développement a commencé le deuxième jour. *Repiquage positif.*

Milieu au sérum : *culture positive* dans deux tubes seulement. *Repiquage négatif.*

Moëlle osseuse.

Frottis : *très nombreux corps de Leishman*, en amas ou disséminés, en majorité intracellulaires.

Milieu NNN : tous les tubes ont montré un *développement normal*; un tube est souillé le 7^e jour par un bacille très mobile qui n'empêche pas pourtant la survie des leishmanies. *Les repiquages sont positifs*.

Milieu au sérum : tous les tubes montrent un *développement intense*, mais les *réensemencements sont négatifs*; le repiquage en milieu NNN au sang total donne des subcultures normales, ce qui nous permet d'entretenir cette souche par passage tous les 21 jours.

En résumé, l'hémoglobine ne paraît pas être l'élément indispensable au développement des leishmanies en culture; ces parasites se cultivent très bien dans un milieu au sérum, frais ou inactivé, dépourvu de toute trace d'hémoglobine; mais la culture ne peut être repiquée dans ce même milieu. Ni l'hémoglobine, ni la fibrine, ni les leucocytes, ni l'extrait globulaire ne permettent d'obtenir des subcultures. *Il semble que le sang total soit nécessaire à cet effet*.

Le milieu au sérum permet l'isolement des leishmanies des organes d'animaux infectés. Il présente, en outre, l'avantage d'être transparent et incolore, ce qui pourrait permettre une étude plus précise des caractères biochimiques des leishmanies; en particulier de celle de la fermentation des sucres.

E. — REMPLACEMENT DU SANG DE LAPIN PAR LE SANG DE DIVERSES ESPÈCES ANIMALES

Il était intéressant de savoir si le sang de divers animaux, autres que le lapin, pouvait servir à préparer le milieu NNN. D'autre part, devant les nombreux échecs de culture du sang périphérique, certains auteurs ont incriminé le sang du malade d'être porteur d'une substance empêchante.

Nous avons essayé de cultiver les leishmanies dans un milieu au sang humain.

Pour tous les sangs éprouvés, la technique suivie est la même que pour le sang de lapin.

Sang humain.

Prélevé par ponction aseptique de la veine du pli du coude.

La culture est normale et repiquable en série.

Sang de cheval.

Prélevé par ponction de la jugulaire.

Le développement ne commence que vers le 5^e ou 6^e jour; la *culture* *reste pauvre* et ne dépasse pas 40 jours. Le repiquage est positif, mais inconstant. Ces résultats sont confirmés par Ch. Anderson et L. Balozet (4) qui n'arrivent pas à cultiver *Leishmania donovani* sur un milieu de Bloch, utilisé par Zdrodowsky et Woskressenski (85), où le sang de cheval remplace le sang de lapin.

Sang de bœuf.

Prélevé par ponction de la jugulaire.

Le *développement est normal* et les *réensemencements positifs*.

Sang de mouton.

Prélevé par ponction de la jugulaire.

Mêmes caractères culturaux et morphologiques que dans le milieu au sang de lapin.

Sang de chien.

Prélevé par ponction de la jugulaire.

La *culture est pauvre*; la multiplication commence vers le 5^e jour et s'arrête au 15^e-16^e jour; la vitalité de la culture ne dépasse pas 40 à 42 jours. Le *repiquage est possible*, mais donne aussi des *cultures très pauvres*.

Sang de cobaye.

Prélevé par ponction aseptique du cœur.

Se comporte comme le sang de lapin.

Sang de rat.

Prélevé par ponction cardiaque.

Se comporte aussi comme le sang de lapin.

Sang de tortue.

L'animal est tué; on fait sauter la carapace; le cœur est mis à nu. On aseptise la région avec de la teinture d'iode; on flambe et on ponctionne l'artère aorte commune.

Les *cultures sont très pauvres* et restent telles pendant toute la durée du développement, qui ne dépasse pas 20 jours. Les *repiquages*

sont négatifs. La morphologie des leishmanies ne subit aucune modification.

Sang de crapaud.

On met le cœur à nu après sacrifice de l'animal et on ponctionne après aseptie à la teinture d'iode et flambage.

Même résultat que le sang de tortue.

Sang de couleuvre.

La couleuvre est tuée. On ouvre la peau sur la ligne médiane du ventre. On aseptise la région et on ponctionne le cœur.

Même résultat que pour le sang de tortue.

En résumé, tous les sangs ne sont pas aptes à la culture des leishmanies. Dans la préparation du milieu NNN, nous pouvons remplacer, sans inconvénients, le sang de lapin par du sang d'homme, de bœuf, de mouton, de cobaye ou de rat. Le sang de cheval, de chien donne une culture pauvre. Avec le sang des animaux à sang froid, on obtient des cultures très pauvres et non repiquables en série.

**F. — REMPLACEMENT DU SÉRUM DE LAPIN
PAR LE SÉRUM DE DIVERSES ESPÈCES ANIMALES**

Nous avons utilisé les sérums d'homme, de cheval, de bœuf, de mouton, de chien, de cobaye et de rat. Les animaux à sang froid ne nous ont pas fourni assez de sang pour permettre la séparation du sérum.

Sérum d'homme.

Aucune différence avec le sérum de lapin. *Pas de subculture.*

Sérum de cheval.

Les cultures ont toujours été négatives.

Sérum de bœuf.

Culture normale. Repiquage négatif.

Sérum de mouton.

Culture normale. Repiquage négatif.

Sérum de chien.

Les leishmanies *ne poussent pas* sur un milieu au sérum de chien.

Sérum de cobaye.

Culture normale. Repiquage négatif.

Sérum de rat.

Culture normale. Repiquage négatif.

La concordance entre le sérum et le sang est donc parfaite. Les leishmanies poussent difficilement dans un milieu au sang de cheval ou de chien; elles ne se cultivent pas dans un milieu au sérum de ces mêmes animaux.

**G. MODIFICATIONS APPORTÉES A LA CULTURE PAR ADDITION,
AU MILIEU NNN, D'ÉLÉMENTS DIVERS**

I. — Addition de glucides

Beaucoup d'auteurs ont étudié l'action des glucides sur les flagellés, mais leurs travaux ont porté, en général, sur les trypanosomes, et c'est le glucose qui a surtout eu la faveur des expérimentateurs.

Dès 1911, C. Biot, R. Biot et G. Richard (9), puis K. Schern (80), et plus récemment W. Yorke, A. R. D. Adams et F. Murgatroyd (84) ont attiré l'attention sur l'influence favorable du glucose dans le développement des trypanosomes. Yorke et ses collaborateurs pensent même qu'il est, pour ces flagellés, un aliment essentiel. H. Galliard (26) insiste sur le rôle du glucose, qui exercerait une influence nettement favorable sur la richesse et la durée de la culture.

M. H. Soule (82), étudiant le coefficient respiratoire de *Trypanosoma lewisi* et de *Leishmania tropica*, a vu ce chiffre se rapprocher de l'unité lorsqu'on ajoutait du glucose, au milieu de culture. R. Kudicke et E. Evers (29) ont montré, qu'en ajoutant à du bouillon, certains glucides, on pouvait augmenter le temps de survie de *Trypanosoma brucei*.

Ces faits ont servi de base à l'établissement de divers milieux de culture sucrés pour les flagellés (W. Hagemeister (27); I. J. Kligler (28); H. Noguchi et E. B. Tilden (65); H. Bonacci (10).)

Nous avons étudié l'action de certains glucides sur la culture des leishmanies, d'abord en milieu NNN au sang total, puis en milieu au sérum. Nous avons préparé des milieux contenant 1 % de chacun des glucides suivants :

lactose	lévulose	érythrite
mannite	arabinose	glycogène
maltose	raffinose	amidon
saccharose	galactose	inuline
glucose	dulcité	dextrine

La technique employée est la suivante :

On fait une solution aqueuse du glucide à étudier à une concentration variable suivant la solubilité du produit. Cette solution est tyndallisée trois fois à l'autoclave *couvercle posé* à un jour d'intervalle. On en ajoute à la gélose salée liquéfiée, une quantité calculée telle que le milieu soit à 1 %. On distribue ensuite le sang de lapin. On termine comme pour le milieu NNN ordinaire.

Voici les résultats que nous avons obtenus :

a) MILIEU NNN

Lactose.

La multiplication apparaît le 3^e-4^e jour; le développement est très rapide et au 10^e jour la culture est luxuriante. Cette densité se maintient jusqu'au 35^e-40^e jour, puis diminue rapidement pour s'annuler vers le 65^e jour.

Mannite.

Ce sucre n'apporte aucune amélioration à la culture

Maltose.

Le début du développement est normal; vers le 8^e jour, la culture *est très riche*; la multiplication se poursuit jusqu'au 30^e jour; les leishmanies restent très nombreuses jusqu'au 40^e-42^e jour. La durée de la culture est voisine de 75 jours.

Saccharose.

La culture est normale,

Glucose.

Ce sucre favorise légèrement la culture; la durée n'en est pas augmentée, mais la richesse est appréciable.

Lévuiose.

Pas d'amélioration.

Arabinose.

Pas d'amélioration.

Raffinose.

Culture normale.

Galactose.

Culture normale.

Dulcite.

Aucune amélioration.

Erythrite.

Aucune amélioration.

Glycogène.

Culture normale.

Amidon.

Culture normale.

Inuline.

Culture normale.

Dextrine.

Culture normale.

b) MILIEU AU SÉRUM

Pour le milieu au sérum, nous n'avons employé que les sucres qui se sont montrés favorables à la culture des leishmanies dans le milieu XXX, à savoir : le lactose, le maltose et le glucose. Nous avons obtenu des résultats identiques. Les cultures, surtout avec le maltose, sont très riches et la vitalité augmentée. Pourtant, cette addition *ne permet pas d'obtenir des repiquages.*

II. — Addition de sels métalliques

La présence de sels métalliques peut, soit être indispensable au développement de certains protozoaires, soit favoriser seulement leur multiplication en culture.

Nous avons étudié l'influence de certains sels sur la culture des leishmanies dans le milieu NNN et dans le milieu au sérum de lapin. Nous avons additionné la gélose du produit étudié, à deux concentrations différentes : 0,05 ‰ et 1 ‰.

Pour les milieux à 1 ‰, on fait une solution aqueuse à 4 % de sel; on stérilise 25 minutes à l'autoclave à 120°; on verse 0 c.c. 25 de cette solution dans 9 c.c. de gélose liquéfiée et maintenue à 50-52°. On distribue ensuite le sang ou le sérum.

Pour la concentration de 0,05 ‰, la technique est la même: on utilise alors une solution de sel à 0 gr. 20 %.

Nous avons essayé les sels suivants :

Sulfate de zinc : SO_4Zn , 7 OH^2 .

Sulfate de manganèse : SO_4Mn , 4 OH^2 .

Sulfate de fer : SO_4Fe , 7 OH^2 .

Sulfate de magnésium : SO_4Mg , 7 OH^2 .

Sulfate d'aluminium : $(\text{SO}_4)_3\text{Al}^2$, 18 OH^2 .

Chlorure de calcium : Cl^2Ca , 6 OH^2 .

a) MILIEU NNN

Sulfate de zinc.

Aux deux concentrations étudiées, le milieu prend une coloration brune qui s'accroît de plus en plus, l'eau de condensation restant incolore; il rappelle les milieux au sang chauffé.

La culture est positive et son évolution normale.

Sulfate de manganèse.

A la concentration de 0,05 ‰ l'aspect du milieu ne change pas: la culture est pauvre et disparaît en moins de 15 jours. Le repiquage est négatif.

A la concentration de 1 ‰, le milieu brunit; *les leishmanies ne poussent pas*.

Sulfate de fer.

Le milieu brunit par suite de l'oxydation du sel ferreux.
La culture est inchangée aux deux concentrations.

Sulfate de magnésium.

La culture ne subit aucune modification.

Sulfate d'aluminium.

Cette addition ne modifie en rien la culture des leishmanies en milieu NXX.

Chlorure de calcium.

La culture subit une amélioration sensible; le développement commence le 3^e jour; les formes de multiplication sont nombreuses; la culture est très riche du 15^e au 35^e jour, puis sa densité diminue et s'annule en même temps que les témoins.

b) MILIEU AU SÉRUM

Les résultats sont parallèles à ceux obtenus avec le milieu au sang total. Les sulfates de zinc, de magnésium, d'aluminium et de fer n'ont pas modifié la culture. Avec le sulfate manganéux le développement est empêché aux deux concentrations. Avec le chlorure de calcium, la culture est plus riche qu'à l'ordinaire.

Aucun sel ne permet d'obtenir des subcultures.

Notons qu'avec le sulfate de zinc, le milieu blanchit et devient opaque, et qu'avec le sulfate de manganèse, il brunit et reste transparent.

III. — Addition de glycérol

L'action destructrice du glycérol à l'égard des bactéries est bien connue. Toutefois, le mécanisme de cette action n'est pas si simple qu'on l'enseigne communément; il varie d'abord d'une espèce microbienne à l'autre. En outre, le glycérol tue les microbes d'autant plus rapidement que sa concentration est plus élevée dans le milieu, ce qui

sé conçoit; mais d'autant plus rapidement aussi que la dilution de la suspension bactérienne est plus grande. R. Durand (23), qui a récemment précisé ces faits, a bien mis en évidence l'importance primordiale d'un autre facteur, la température. Telle suspension bactérienne, stérilisée en quelques heures sous l'action du glycérol à l'étuve à 37°, résiste pendant des mois au même antiseptique, si le contact a lieu à la glacière ou au frigorifique.

Nous savons, depuis Rogers (1906), que la présence des bactéries gêne le développement des leishmanies dans les cultures. En réalité, ces flagellés tolèrent parfaitement le voisinage de certains germes tels que staphylocoque, streptocoque, mélitocoque (12-81). Au contraire, les bacilles du colon, les bacilles typhoïde et paratyphoïdes A et B, le vibron cholérique, les bacilles dysentériques et les protéus nuisent à leur développement.

Ces faits nous ont incité à essayer la purification des cultures de leishmanies, en additionnant de glycérol stérile, l'eau de condensation des tubes de milieu NNX. Le glycérol est ajouté avant l'ensemencement, en quantité égale au volume de l'eau de condensation.

Nous avons d'abord étudié le comportement d'une culture pure de leishmanies dans un tel milieu. Nous avons constaté que le glycérol n'empêchait pas le développement de ces flagellés; bien au contraire, la survie en est plus longue; peut-être parce que le milieu se dessèche plus lentement: nous avons pu conserver des cultures vivantes pendant trois mois; la mobilité n'est pas modifiée malgré la viscosité du liquide.

Pour étudier la purification des cultures, nous avons ensemencé plusieurs tubes de milieu NNX glycérolé avec un mélange de leishmanies et de différents microbes (colibacille, streptocoque, staphylocoque, bacilles typhoïde et paratyphoïdes A et B), en ayant soin de ne pas toucher la gélose.

Dans tous les tubes, seules les leishmanies se sont développées. Pour vérifier l'absence de bactéries, nous avons ensemencé, au 13^e jour, des tubes de bouillon nutritif, qui restèrent stériles. Dans les tubes témoins (NXN sans glycérol), la souillure prit le dessus et les leishmanies disparurent en quelques jours.

L'addition de glycérol au milieu NNN, apporte donc les avantages suivants :

- 1° Dessication moins rapide du milieu;
- 2° Durée de la culture augment  e;
- 3° Contamination bactérienne   vit  e;
- 4° Purification possible des cultures de leishmanies souill  es par des bactéries.

IV. --- Addition de corps inertes

Nous avons choisi la poudre de charbon animal, poudre inerte dou  e de propriété adsorbante très   lev  e. Sa présence dans le milieu NNN pourrait, en adsorbant les substances nocives, améliorer la culture des leishmanies.

La poudre est st  rilis  e au four Pasteur à trois reprises à 24 heures d'intervalle. On la répartit dans l'eau de condensation des tubes de milieu NNN, à l'aide d'une petite cuiller de platine stérile. On en s  mence aussitôt après.

La culture n'est point modifi  e; les leishmanies se développent comme dans le milieu NNN classique; le nombre de rosaces ne se trouve pas augmenté, comme on pourrait le penser, par agglutination des parasites autour des grosses particules de charbon.

CHAPITRE III

Essais de culture des leishmanies dans des milieux divers

I. — MILIEU AU PETIT LAIT ⁽¹⁾

Dans une première série d'expériences, Ch. Anderson (3), remarquant que les enfants atteints de kala azar étaient presque toujours nourris de lait de chèvre, obtenait la culture en série des leishmanies dans du lait de chèvre et du lait de vache. Plus tard, ce même auteur constatait que le développement de ces flagellés était très inconstant et très capricieux, dans ce milieu « qui ne pouvait, dès lors, constituer qu'une acquisition sans valeur pratique » (4).

Nous avons répété ces expériences et nous avons constaté qu'il y avait bien une conservation du parasite pendant un temps plus ou moins long, mais nous n'avons jamais pu obtenir de culture en série dans le lait.

Nous avons essayé de cultiver les leishmanies dans un milieu au petit lait préparé de la façon suivante :

100 c.c. de lait sont chauffés à 40° puis additionnés de III gouttes de présure commerciale; on laisse coaguler à l'étuve à 37° pendant 2 heures environ; on fend le caillot avec un couteau et on met le récipient à la glacière, pendant une nuit, pour faciliter l'exsudation du petit lait. On jette alors le tout sur un double de gaze tendu sur un entonnoir et on reçoit le filtrat dans un récipient. On chauffe 1/2 heure au bain-marie à 90°. On ajoute 0 gr. 10 de chlorure de calcium, et on précipite à l'autoclave « couvercle posé » 10 à 15 minutes. Dès la sortie de l'autoclave, on ajoute 1 gr. de carbonate de calcium; on laisse 10 minutes en contact, en agitant de temps en temps. On neutralise, si besoin est, avec du carbonate de sodium et on filtre sur papier Chardin mouillé. Le filtrat est limpide et présente une légère teinte glauque. On stérilise par filtration à la bougie Chamberland I.3.

(1) Nos essais sur le petit lait étaient déjà terminés lorsque Ch. Anderson (4) publiait le résultat qu'il obtenait avec ce même produit préparé d'ailleurs suivant une autre technique que la nôtre. Nos résultats apportent donc une confirmation de ses travaux.

On répartit ce petit lait dans des tubes de gélose salée liquéfiée à raison de 1 c.c. par tube.

Les leishmanies ne se développent pas dans ce milieu.

II. — MILIEU AU LAGMI (VIN DE DATTIER)

On connaît l'existence de flagellés dans le latex de certaines plantes laticifères.

J. W. Cornwall et H. M. Lafrenais (17) ont constaté que les trypanosomes et les leishmanies se conservent longtemps dans le latex de diverses Euphorbiacées. G. Franchini (25) a montré l'action favorisante, sur le développement de certains flagellés, du latex de plantes appartenant aux familles des Euphorbiacées, des Apocynacées ou des Artocarpées.

Ces faits nous ont poussé à tenter la culture des leishmanies dans un milieu à base de *lagmi*.

Le *lagmi*, ou vin de dattier, est la sève du *Phénix datylijéra* (Palmyers) que les indigènes de Tunisie consomment comme boisson courante. Examiné sitôt après sa récolte, ce liquide est sucré, légèrement opalescent et de consistance sirupeuse; une fermentation rapide s'établit, grâce à une levureensemencée à l'aide d'un *lagmi* déjà fermenté, donnant ainsi un liquide dont le degré alcoolique ne dépasse jamais 6°. Les indigènes consomment, soit le produit doux, au plus tard 3 ou 4 heures après la récolte, soit le produit fermenté.

Nous avons préparé des milieux avec les deux sortes de *lagmi*; la technique était la suivante : le produit est filtré sur papier puis sur bougie Chamberland L3 pour le débarrasser des levures et des souillures. On en vérifie la stérilité en ensemençant sur gélose nutritive et sur milieu glucosé de Sabouraud. On répartit le *lagmi* dans des tubes de gélose liquéfiée à raison de 1 c.c. par tube. Onensemence dans l'eau de condensation.

Ni le *lagmi* doux, ni le *lagmi* fermenté *n'ont permis la culture des leishmanies*.

III. MILIEUX SYNTHÉTIQUES CHIMIQUEMENT DÉFINIS

« Il est très souvent utile, écrit A. Berthelot (7), quand on cherche à réaliser un milieu synthétique, de tenir compte des données que

nous possédons sur la composition chimique des milieux naturels. De même, il est parfois avantageux, dans le choix des produits animaux et végétaux utilisables pour la préparation des liquides nutritifs, de s'inspirer des renseignements d'ordre chimique ou physico-chimique que nous fournit la formule établie de certains milieux chimiquement définis ».

Les résultats que nous avons obtenus avec le sérum nous ont incité à préparer des milieux dont les substances nutritives étaient fournies par des liquides dont la composition se rapproche de celle du sérum.

Nous avons imaginé les trois formules suivantes :

FORMULE N° 1.

Urée.....	0 40
Sulfate de calcium.....	0 20
Phosphate de magnésium.....	0 05
Chlorure de sodium.....	4 50
Chlorure de potassium.....	2
Glucose.....	1 20
Ovalbumine.....	80
Eau distillée, quantité suffisante pour.....	1.000

FORMULE N° 2.

Urée.....	0 40
Sulfate de calcium.....	0 20
Phosphate de magnésium.....	0 05
Chlorure de sodium.....	4 50
Chlorure de potassium.....	2
Glucose.....	1 20
Ovalbumine.....	80
Solution saturée d'albuminate de fer, quantité suffisante pour.....	1.000

FORMULE N° 3.

Urée.....	0 40
Sulfate de calcium.....	0 20
Phosphate de magnésium.....	0 05
Chlorure de sodium.....	4 50
Chlorure de potassium.....	2
Glucose.....	1 20
Bouillon nutritif, quantité suffisante pour.....	1.000

Pour ces trois milieux, la stérilisation est effectuée à la bougie Chamberland L3. Le liquide est distribué dans de la gélose liquéfiée à raison de 1 c.c. par tube. On ensemence dans l'eau de condensation.

Aucune de ces trois formules n'est favorable à la culture des leishmanies.

Conclusions

Le milieu NNN classique, conçu empiriquement, constitue, pour la culture des leishmanies, le milieu de choix. Malgré une légère inconstance dans la forme de l'évolution de la culture, il reste le milieu le plus sûr pour le diagnostic des leishmanioses et l'entretien des souches de leishmanies, de leptomonas et de certains trypanosomes. Son emploi, dans tous les laboratoires de recherches, apporte la meilleure preuve de sa valeur.

Les modifications que nous y avons apportées, ne nous donnent pas assez de satisfaction pour nous permettre de préconiser un milieu nouveau.

Notre travail apporte, néanmoins, des précisions sur certains détails de technique. On peut le résumer ainsi :

I. — *L'hypotonie est défavorable, tandis qu'une légère hypertonie favorise le développement des leishmanies.*

Limites de concentration en ClNa : 4 gr. à 35 gr. ‰; optimum : 15 ‰.

II. — *Un légère acidité est favorable à la culture.*

pH limites : 5,5 à 8,5; pH optimum : 6 à 6,5.

III. — *Températures limites : 15° à 30°; température optima : 22°.*

IV. — *Le chauffage du milieu, malgré certains avantages, ne permet pas de constituer un milieu courant, par suite de l'insuccès des repiquages.*

V. — *La gélose n'intervient pas comme support nécessaire, mais comme une membrane dialysante, permettant la diffusion progressive et l'équilibre des substances nutritives, dans l'eau de condensation.*

VI. — *L'hémoglobine n'est pas nécessaire au développement des leishmanies in vitro.* On peut, en effet, les cultiver dans un milieu au

sérum, exempt de toute trace d'hémoglobine, mais il est impossible d'obtenir des repiquages. L'addition, au sérum, de fibrine, d'hémoglobine, de globules blancs, ou d'extrait globulaire, ne permet pas de combler cette lacune.

VII. — *On peut remplacer le sang ou le sérum de lapin par du sang ou du sérum d'homme, de bœuf, de mouton, de cobaye ou de rat.* Les sangs de cheval, de chien et des animaux à sang froid ne permettent pas la culture des leishmanies.

VIII. — *Le glucose, le lactose et le maltose favorisent le développement en donnant une culture très riche (surtout le maltosé).*

IX. — *Le manganèse, même à des doses infinitésimales, empêche la multiplication des leishmanies; le calcium la favorise; le fer, le zinc, le magnésium et l'aluminium n'ont aucune influence.*

X. — *Le glycérol, ajouté à l'eau de condensation, permet la purification des cultures souillées par des bactéries. Il augmente, en outre, la durée de la culture.*

XI. — *Ni le lait, ni le petit lait, ni le lagmi, doux ou fermenté, ni les milieux synthétiques étudiés n'ont permis d'obtenir des cultures de leishmanies.*

XII. — Un fait essentiel est acquis, à savoir que, seul, le sérum sanguin contient les substances nécessaires à la culture des leishmanies; il y manquerait, seulement, un élément qui, permettant d'obtenir des subcultures, mettra entre les mains des chercheurs, un milieu plus pratique que le milieu XXX, tant par la simplicité de sa préparation que par sa transparence, qui faciliterait l'étude des caractères biochimiques.

BIBLIOGRAPHIE

1. S. ADLER et O. THÉODOR. — **1932.** *Proc. Roy. Soc.*, série B, **Vol. CX**, p. 402
in *Bul. Soc. Pat. Exot.*, t. XXVIII, 1935, p. 426).
2. CH. ANDERSON. — **1932.** *L'Algérie Médicale*, **N° 52**, p. 134.
3. CH. ANDERSON. — **1932.** *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, t. **XXI**, N° 2, p. 294.
4. CH. ANDERSON. — **1935.** *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, t. **XXIV**, N° 1, p. 130.
5. R. G. ARCHIBALD. — **1914.** *Journ. R. Army Med. Corps*, t. **XXIII**, p. 493.
6. L. BALOZET. — **1932.** *C. R. Soc. Biol.*, t. **CX**, p. 917.
7. A. BERTHELOT. — **1930.** *Bul. de la Soc. Chim. Biol.*, t. **XII**, p. 1025.
8. F. BEZANÇON et GRIFFON. — **1900.** *Congrès international de médecine*.
9. C. BIOT, R. BIOT et G. RICHARD. — **1911.** *C. R. Soc. Biol.*, t. **LXXI**, p. 368.
10. H. BONACCI. — **1931.** *C. R. Soc. Biol.*, t. **CVII**, p. 747.
11. J. CAMINOPETROS. — **1934.** *C. R. Soc. Biol.*, t. **CXV**, p. 910.
12. R. M. CARTER. — **1909.** *Brit. Med. Jl.*, 11 septembre, p. 647.
13. G. C. CHATTERJEE. — **1904.** *Lancet*, 3 décembre.
14. G. C. CHATTERJEE. — **1905.** *Lancet*, 7 et 21 janvier.
15. N. I. CHODUKIN et F. I. SCHEWTSCHENKO. — **1928.** *Pensée Med. d'Usbékis-*
tane, **N° 1**, p. 29 in *Trop. Dis. Bul.*, 1929, Vol. XXVI, p. 323).
16. S. R. CHRISTOPHERS. — **1905.** *Scien. Mem. Gov. of Ind.*, **N° 15**.
17. J. W. CORNWALL et H. M. LAFRENAIS. — **1916.** *Ind. Jl. of Med. Res.*, t. **III**,
f. 4, p. 698 (in *Bul. Inst. Pasteur Paris*, 1917, t. XV, p. 490).
18. G. DI CRISTINA et MITRA. — **1911.** *Pathologica*, 15 juin.

19. A. DONATIEN, F. LESTOQUARD et L. PARROT. — **1929.** *Bul. Soc. Pat. Exo.*, t. **XXII**, p. 252.
20. A. DONATIEN et F. LESTOQUARD. — **1935.** *Bul. Soc. Pat. Exo.*, t. **XXVIII**, p. 426.
21. C. DONOVAN. — **1913.** *Ind. Jl. of Med. Res.*, t. **I**, f. 1, p. 177.
22. C. DONOVAN. — **1903.** *Brit. Med. Jl.*, 11 juillet, p. 79.
23. R. DURAND. — **1935.** *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, t. **XXIV**, N° 1, p. 124.
24. G. FRANCHINI. — **1911.** *Pathologica*, 15 août.
25. G. FRANCHINI. — **1924.** *Bul. Soc. Pat. Exo.*, t. **XVII**, p. 32.
26. H. GALLIARD. — **1929.** *Annales de Parasitologie*, pp. 248 et 367.
27. W. HAGEMEISTER. — **1914.** *Ztsch. f. Hyg. Inf.* t. **LXXVII**, p. 227 (in *Précis de Microscopie*, M. LANGERON (Masson, Paris, 1934, 5^e édit.), p. 739).
28. I. J. KLIGLER. — **1924.** *Amer. Jl. of Trop. Med.*, t. **IV**, p. 69 (in *Précis de Microscopie*, M. LANGERON (Masson, Paris, 1934, 5^e édit.), p. 740).
29. R. KUDICKE et E. EVERS. — **1924.** *Ztschr. f. Hyg.*, t. **CI**, p. 317 in *Trop Dis. Bul.*, 1924, t. **XXI**, p. 424).
30. M. LANGERON. — **1934.** *Précis de Microscopie* (Masson, Paris, 5^e édit.).
31. A. LAVERAN. — **1917.** *Leishmanioses* (Masson, Paris).
32. A. LAVERAN. — **1903.** *Bul. Acad. Med.*, 3 novembre, p. 238.
33. A. LAVERAN et F. MESNIL. — **1903.** *C. R. Acad. Sci.*, 7 décembre, t. **CXXXVII**, p. 957.
34. A. LAVERAN et F. MESNIL. — **1904.** *C. R. Acad. Sci.*, 25 janvier, t. **CXXXVIII**, p. 187.
35. A. LAVERAN. — **1904.** *Bul. Acad. Med.*, 22 mars, p. 247.
36. A. LAVERAN. — **1916.** *Bul. Soc. Pat. Exo.*, t. **IX**, p. 265.
37. W. B. LEISHMAN. — **1903.** *Brit. Med. Jl.*, 30 mai et 21 novembre.
38. W. B. LEISHMAN et J. C. B. STATHAM. — **1905.** *Jl. R. Army Med. Corps*, t. **III**.

39. F. LESTOQUARD. — **1926.** *C. R. Soc. Biol.*, t. **XCIV**, p. 1326.
40. A. LWOFF. — **1930.** *C. R. Soc. Biol.*, t. **GIV**, p. 664.
41. A. LWOFF. — **1932.** *Recherches Biochimiques sur la Nutrition des Protézoaires.* Monographie de l'Institut Pasteur de Paris (Masson, Paris)
42. M. LWOFF. — **1929.** *Bul. Soc. Pat. Exo.*, t. **XXII**, p. 247.
43. M. LWOFF. — **1928.** *C. R. Soc. Biol.*, t. **XCIX**, p. 472.
44. M. LWOFF. — **1930.** *C. R. Soc. Biol.*, t. **GIV**, p. 666.
45. J. MAC KENZIE. — **1905.** *Jl. R. Army Med. Corps*, t. **V**, p. 628.
46. J. MARZINOWSKI et S. L. BOGROFF. — **1904.** *Virchow's Archiv*, t. **CLXXVIII** in *Leishmanioses*, LAVERAN (Masson, Paris, 1917), p. 310).
47. C. MATHIS. — **1906.** *C. R. Soc. Biol.*, t. **LXI**, p. 550.
48. C. MATHIS. — **1911.** *C. R. Soc. Biol.*, t. **LXXI**, p. 538.
49. E. L. NAPIER. — **1924.** *Ind. Jl. of Med. Res.*, t. **XI**, f. 3, p. 733.
50. L. NATTAN-LARRIER et NICOLAÏDES. — **1906.** *Soc. Med. des Hôpitaux de Paris*, 23 novembre.
51. L. NATTAN-LARRIER et L. GRIMARD-RICHARD. — **1934.** *C. R. Soc. Biol.*, t. **CXVI**, p. 492.
52. L. NATTAN-LARRIER et L. GRIMARD-RICHARD. — **1933.** *C. R. Soc. Biol.*, t. **CXIII**, p. 1489.
53. J. MAC NEAL et F. G. NOVY. — **1903.** *Contrib. to. Med. Res.*, p. 549 (in *Bul. Inst. Pasteur Paris*, 1903, p. 602).
54. CH. NICOLLE. — **1908.** *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, p. 206.
55. CH. NICOLLE. — **1911.** *VII^e Congrès de Pédiatrie*, Palerme.
56. CH. NICOLLE. — **1908.** *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, pp. 3, 17 et 119.
57. CH. NICOLLE. — **1908.** *C. R. Acad. Sci.*, 2 mars, t. **CXLVI**, p. 498.
58. CH. NICOLLE et A. SIGRE. — **1908.** *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, p. 161.
59. CH. NICOLLE et A. SIGRE. — **1908.** *C. R. Soc. Biol.*, t. **LXIV**, p. 1096.

60. CH. NICOLLE et L. MANCEAUX. — **1910**. *C. R. Acad. Sci.*, 4 avril, t. **CL**, p. 889.
61. CH. NICOLLE. — **1908**. *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, pp. 55, 71 et 108.
62. CH. NICOLLE. — **1909**. *Annales Inst. Pasteur Paris*, t. **XXIII**, pp. 447 et 361.
63. F. G. NOVY et W. J. MAC NEAL. — **1903**. *Jl. of the Amer. Med. Assoc.*, 21 novembre (in *Inst. Pasteur Paris*, 1904, p. 60).
64. F. G. NOVY et W. J. MAC NEAL. **1904**. *Jl. of Inf. Dis.*, t. **I**, 2 janvier (in *Bul. Inst. Pasteur Paris*, 1904, p. 60).
65. H. NOGUCHI et E. B. TILDEN. — **1926**. *Jl. of Exper. Med.*, t. **XLIV**, p. 307 (in *Précis de Microscopie*, M. LANGERON (M. Masson, Paris, 1934, 5^e édit.), p. 739).
66. A. PONSELLE. — **1913**. *C. R. Soc. Biol.*, t. **LXXIV**, p. 339.
67. A. PONSELLE. — **1923**. *An. de Parasitol.*, t. **I**, pp. 155 et 185.
68. F. PORCELLI TITONE. — **1916**. *Pédiatria*, t. **XXIV**, p. 147.
69. Miss M. ROBERTSON. — **1911**. *Philosophical Trans. of the Roy. Soc. of London*, Série B, Vol. **CCII**, p. 29 (in *C. R. Soc. Biol.*, 1913, t. **LXXIV**, p. 341).
70. L. ROGERS. — **1897** et **1898**. *Ind. Med. Gaz.* (in *Leishmaninases*, LAVERAN, 1917, Masson, Paris), p. 45).
71. L. ROGERS. — **1904**. *Lancet*, 23 juillet.
72. L. ROGERS. — **1905**. *Lancet*, 3 juin.
73. L. ROGERS. — **1906**. *Roy. Soc.*, 26 février, p. 284.
74. R. ROSS. — **1899**. *Report of the Nature of K. A. (Calcutta)* (in LAVERAN, *Leishmanioses* (1917, Masson, Paris), p. 45).
75. R. ROSS. — **1903**. *Brit. Med. Jl.*, 14 et 28 novembre.
76. R. ROW. — **1912**. *Brit. Med. Jl.*, 28 mai (in *An. Inst. Pasteur Paris*, 1912, p. 1119).
77. R. ROW. — **1930**. *Ind. Med. Gaz.*, t. **LXV**, N° 6, p. 79.

78. R. ROW. — **1912.** *Brit. Med. Assoc.*, juillet.
79. A. J. SALLE et C. L. A. SCHMIDT. — **1923.** *Jl. Inf. Dis.*, t. **XLIII**, p. 378.
80. K. SCHERN. — **1925.** *Contrib. f. Bakt., I Abt, Orig.*, t. **XCVI**, p. 536 (in *Précis de Microscopie*, M. LANGERON (Masson, Paris, 1934, 5^e édit.), p. 738).
81. G. SPAGNIOLO. — **1912.** *Malaria e Mal. di Paesi Caldi*, t. **III**, pp. 103 et 151.
82. M. H. SOULE. — **1925.** *Jl. Inf. Dis.*, t. **XXXVI**, p. 245.
83. J. H. WRIGHT. — **1903.** *Jl. of Med. Res.*, décembre, N. S., t. **V**, p. 472.
84. W. YORKE, A. R. D. ADAMS et F. MURGATROYD. — **1929.** *An. of Trop. Med. and Paras.*, t. **XXIII**, p. 501 (in *Précis de Microscopie*, M. LANGERON, (Mason, 5^e édit., Paris), p. 738).
85. P. ZDRODOWSKY et B. WOSKRESSENSKI. — **1930.** *Bul. Soc. Pat. Exo.*, t. **XXIII**, p. 1028.

VU, BON A IMPRIMER :

Le Président de la Thèse,

H. COUTIÈRE.

VU :

Le Doyen de la Faculté,

P. GUÉRIN.

Le Recteur de l'Académie de Paris,

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

S. CHARLÉTY.

